

# **Einfluss verschiedener Entzündungen des männlichen Genitalsystems auf die Funktionalität menschlicher Spermatozoen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Anne Sturmhoefel  
geboren am 19.08.1982 in Sonneberg

## **Gutachter**

1. Chefarzt PD Dr. Zermann

2. Prof. Dr. Henkel

3. Prof. Dr. Schreiber

**Tag der öffentlichen Verteidigung:** 15.05.2007

## Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>1. Zusammenfassung</b>	
<b>2. Einleitung</b>	<b>1</b>
2.1 Aufbau des männlichen Genitalsystems	1
2.1.1 Der Hoden	1
2.1.2 Der Nebenhoden	2
2.1.3 Die Samenblase	2
2.1.4 Die Prostata	3
2.1.5 Die Bulbourethraldrüse	3
2.2 Die Spermatogenese	3
2.3 Das Spermatozoon	4
2.4 Zusammensetzung des Ejakulates	6
2.5 Die Fertilisation	7
2.6 Entzündungen des männlichen Genitalsystems	9
2.6.1 Ursachen für Entzündungen des männlichen Genitalsystems	9
2.6.2 Arten von Entzündungen des männlichen Genitalsystems	10
2.6.2.1 Orchitis	10
2.6.2.2 Epididymitis	11
2.6.2.3 Prostatitis	12
2.6.2.4 Vesikulitis	12
2.6.2.5 Urethritis	13
2.6.3 Auswirkungen von Entzündungen des Genitaltraktes auf die Spermienqualität	13
2.6.3.1 Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Spermienqualität	14
2.6.3.2 Einfluss von Proteasen auf die Spermienqualität	15
2.6.3.3 Einfluss von Zytokinen auf die Spermienqualität	16
2.6.4 Folgen von Entzündungen des Genitalsystems für die männliche Fertilität	17
<b>3. Ziele der Arbeit</b>	<b>18</b>

<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
4.1	Chemikalien	19
4.2	Ejakulate und Ejakulatanalyse	19
4.3	HTF-Medium	20
4.4	Bestimmung der Spermatozoenmorphologie	21
4.4.1	Shorr-Färbung	21
4.4.2	Papanicolaou-Färbung	22
4.4.3	Testsimplet-Färbung	23
4.5	Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	24
4.5.1	Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies im Ejakulat	24
4.5.2	Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies in Spermatozoen	26
4.6	Bestimmung des Anteils Peroxidase-positiver Zellen	27
4.7	Nachweis der DNA-Fragmentation in Spermatozoen mittels TUNEL-Assay	27
4.8	Fotodokumentation	29
4.9	Statistische Auswertung	29
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
5.1	Spermienmorphologie	30
5.1.1	Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und pH-Wert, Spermiendichte, -motilität und -vitalität	31
5.1.2	Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und Leukozytenkonzentration des Ejakulates	33
5.1.3	Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und ROS-Produktion	34
5.1.3.1	Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und extrinsischer ROS-Produktion	34
5.1.3.2	Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und intrinsischer ROS-Produktion	35
5.1.4	Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und DNA-Fragmentation der Spermatozoen	37
5.2	Leukozytenkonzentration	38
5.3	ROS-Produktion	38

5.3.1	Einfluss der extrinsischen ROS-Produktion auf verschiedene Spermatozoenparameter	39
5.3.2	Einfluss der intrinsischen ROS-Produktion auf verschiedene Spermatozoenparameter	40
5.4	DNA-Fragmentation	43
5.5	Vergleiche zwischen verschiedenen Entzündungen des männlichen Genitalsystems	45
5.5.1	Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit Entzündung im Genitaltrakt und Ejakulaten von Patienten ohne entsprechende Entzündung	46
5.5.2	Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit früher bzw. später Infektion des Genitaltraktes	47
5.5.3	Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit verschiedenen Infektionen des Genitalsystems	48
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>54</b>
6.1	Zusammenhänge zwischen verschiedenen Spermatozoen-Parametern	54
6.1.1	Zusammenhänge zwischen der Spermatozoenmorphologie und verschiedenen Spermatozoenparametern	54
6.1.2	Zusammenhänge zwischen der Leukozytenkonzentration im Ejakulat und verschiedenen Spermatozoenparametern	56
6.1.3	Zusammenhänge zwischen ROS-Produktion und verschiedenen Spermatozoenparametern	60
6.1.4	Zusammenhänge zwischen der DNA-Fragmentation der Spermien und verschiedenen Spermatozoenparametern	64
6.2	Vergleich zwischen verschiedenen Entzündungen des männlichen Genitalsystems	68
6.2.1	Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit und ohne Entzündung des Genitaltraktes	68
6.2.2	Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit Orchitis und anderen Entzündungen des Genitaltraktes	69
6.2.3	Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit Epididymitis und anderen Entzündungen des Genitaltraktes	71

6.2.4	Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit Prostatitis und anderen Entzündungen des Genitaltraktes	<b>73</b>
6.2.5	Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit Vesikulitis und anderen Entzündungen des Genitaltraktes	<b>75</b>
6.2.6	Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit MAGI und anderen Entzündungen des Genitaltraktes	<b>76</b>
6.2.7	Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit frühen und späten Entzündungen des Genitaltraktes	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>116</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang</b>	<b>118</b>
10.1	Danksagung	<b>118</b>
10.2	Lebenslauf	<b>120</b>
10.3	Ehrenwörtliche Erklärung	<b>121</b>

## 1. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Entzündungen des männlichen Genitalsystems auf die Ejakulatqualität. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob die Lokalisation einer Genitaltraktentzündung eine Rolle für das Ausmaß der Schädigung der Spermien spielt, oder ob unabhängig vom Ort des inflammatorischen Prozesses eine vergleichbare Beeinträchtigung der Spermienqualität resultiert.

Um diese Fragestellungen beantworten zu können, wurden die Spermiedichte, die Leukozytendichte, der pH-Wert des Ejakulates sowie Spermiovitalität und –motilität bestimmt. Des Weiteren wurde die Spermienmorphologie nach Färbung nach Papanicolaou, Shorr und Testsimplen beurteilt und der Anteil an Spermien mit fragmentierter DNA durch Durchführung des TUNEL-Assays ermittelt. Die intrinsische ROS-Produktion der Spermien wurde mittels einer Dihydroethidium-Fluoreszenzfärbung bestimmt, die extrinsische ROS-Produktion der Leukozyten mit einer Chemilumineszenzreaktion mittels Luminol.

Es stellte sich heraus, dass mit zunehmender Leukozytenkonzentration im Ejakulat die extrinsische ROS-Produktion signifikant anstieg. Hauptquelle der ROS-Produktion sind die Leukozyten. Mit einer zunehmenden Produktion von Sauerstoffradikalen im Ejakulat nahmen Spermiovitalität und –dichte ab, nicht jedoch die Motilität und der Anteil normomorpher Spermien am Ejakulat. Demgegenüber korrelierte jedoch die Leukozytendichte negativ mit dem Anteil normomorpher Spermien, so dass ein schädigender Einfluss von Genitaltraktentzündung auf die Spermienmorphologie angenommen werden muss. Es zeigte sich weiterhin, dass mit einem geringeren Anteil normomorpher Spermien am Ejakulat die Spermiovitalität und –motilität abnahmen. Des Weiteren fand sich bei beeinträchtigter Spermienmorphologie eine erhöhte intrinsische ROS-Produktion. Die ROS-Produktion durch die Spermatozoen selbst korrelierte negativ mit der Spermienmotilität. Auch Spermiedichte und –motilität nahmen bei steigender intrinsischer ROS-Produktion ab, während die DNA-Fragmentation zunahm. Ebenfalls signifikant korrelierten DNA-Fragmentation und extrinsische ROS-Produktion, allerdings weniger ausgeprägt, als intrinsische ROS-Produktion und DNA-Fragmentation. Folglich ist der schädigende Einfluss der intrinsischen ROS-Produktion größer, als der der extrinsischen. Ursache dafür sind vermutlich die antioxidativen Ressourcen des Seminalplasmas, die verhindern, dass die leukozytären Sauerstoffradikale die Spermien in gleichem Maße angreifen, wie die intrinsischen. Bei der ROS-Produktion durch

die Spermatozoen kommt eine besondere Rolle den Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück zu. Durch die enzymatische Ausstattung des Zytoplasmas, das in normomorphen Spermien in diesem Maß fehlt, produzieren diese Spermatozoen besonders viele Sauerstoffradikale und weisen damit auch die ausgeprägtesten Schäden in Bezug auf DNA-Fragmentation, Motilität und Spermindichte auf. In Ejakulaten, in denen sich ein hoher Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentation fand, waren Motilität und Vitalität signifikant niedriger, als in Ejakulaten mit geringer DNA-Fragmentation.

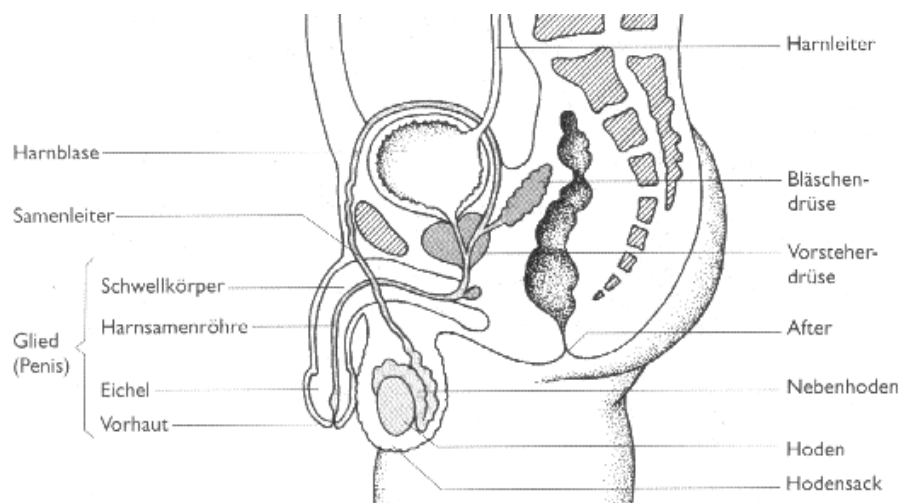
Im Vergleich zwischen den verschiedenen Entzündungen stellte sich heraus, dass Patienten mit Leukozytospemie eine signifikant reduzierte Spermatozoenmotilität und –morphologie aufwiesen. Entzündungen des Genitaltraktes schädigen folglich die Spermien. Bei den Ejakulaten der Orchitis- und Epididymitis-Patienten war die Qualität des Ejakulates im Vergleich zu den Gesunden reduziert, während das bei Prostatitis und Vesikulitis nicht der Fall war. Allerdings fanden sich keine signifikanten Unterschiede im direkten Vergleich zwischen den einzelnen Entzündungen, so dass zwar eine stärkere Schädigung der Spermien bei einer frühen Genitaltraktentzündung gegenüber einer späten wahrscheinlich ist, jedoch nicht mit letzter Sicherheit festgestellt werden kann. Es ist naheliegend, dass bei längerer Einwirkdauer von Produkten entzündlicher Prozesse, insbesondere von Sauerstoffradikalen, die Spermatozoen stärker geschädigt werden, als wenn nur ein kurzer Kontakt stattfindet, wie es bei Prostatitis und Vesikulitis der Fall ist. Andererseits muss aufgrund der hohen Reaktivität und der kurzen Halbwertszeiten der reaktiven Sauerstoffspezies im Milli- bis Nanosekundenbereich davon ausgegangen werden, dass auch bei einer kurzen Einwirkdauer der ROS auf die Spermatozoen bereits eine deutliche Schädigung der Spermien erfolgen kann. Jegliche Entzündung des Genitalsystems ist demnach potentiell schädigend für die Spermienfunktion.



## 2. Einleitung

### 2.1 Aufbau des männlichen Genitalsystems

Ein intaktes männliches Genitalsystem ist eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Spermatogenese und Fertilisation. Abbildung 1 zeigt die anatomische Lage von Hoden, Nebenhoden, Samenleiter, Prostata, Samenblase und Penis mit den umgebenden Organen im männlichen Becken.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Anatomie des männlichen Genitaltraktes (aus: [www.zum.de/Faecher/Bio/SA/stoff9/mannl\\_ge.htm](http://www.zum.de/Faecher/Bio/SA/stoff9/mannl_ge.htm)).

#### 2.1.1 Der Hoden

Die Hoden erfüllen zwei wesentliche Funktionen: die Steroidogenese und die Spermatogenese. Beide Prozesse laufen in funktionell getrennten Kompartimenten ab. In den im Interstitium lokalisierten Leydigzellen erfolgt die Synthese der Geschlechtshormone, in den Tubuli seminiferi, den Samenkanälchen, die Produktion und Reifung der Spermatozoen. Das Interstitium besteht aus den hormonproduzierenden Leydigzellen, lockerem Bindegewebe, immunkompetenten Zellen, Nerven, Blut- und Lymphgefäßen. Keimzellen, Sertoli-Zellen und peritubuläre Zellen sind in den Tubuli seminiferi enthalten. Jeweils bis zu drei der Samenkanälchen sind zu Lobuli zusammengefasst. Jeder Hoden ist in 250-300 Lobuli unterteilt, die durch bindegewebige Septen voneinander getrennt sind. Die Tubuli seminiferi bestehen aus einer Wand (Lamina propria) und dem Keimepithel. In der Lamina propria befinden sich Myofibroblasten, Fibroblasten und kollagene Fasern. Die Myofibroblasten sind Zellen mit kontraktilen Elementen. Sie ermöglichen, dass sich die Tubuli peristaltisch bewegen. So können die Keimzellen in Richtung Nebenhoden weitertransportiert werden. Das

Keimepithel setzt sich aus den Sertoli-Zellen, die als Ammenzellen für die sich entwickelnden Keimzellen während der Spermatogenese dienen, und den Keimzellen selbst zusammen. Es ist durch eine Basalmembran von der Lamina propria abgegrenzt. (Lippert, 2000)

### **2.1.2 Der Nebenhoden**

Der Nebenhoden (Epididymis) besteht im Wesentlichen aus dem etwa 5 m langen Ductus epididymis, der auf 5 cm komprimiert ist und von einer bindegewebigen Hülle, der Tunica albuginea, umgeben wird. Ein Initialsegment, eine Zwischenzone, Nebenhodenkopf (Caput epididymis), -körper (Corpus epididymis) und -schwanz (Cauda epididymis) sind Bestandteile des Nebenhodens. Der Nebenhodenkopf liegt dem oberen Hodenpol an, die Cauda epididymis dem unteren Hodenpol. Ausgekleidet wird der Ductus epididymis von einem Zylinderepithel, das Haupt- und Basalzellen enthält. Diese Zellen üben sekretorische und resorptive Funktionen aus, die eine Reifung der Spermien während ihrer beim Menschen 10-12-tägigen Passage durch den Nebenhoden ermöglichen. Schließlich werden die Spermatozoen im Nebenhodenschwanz bis zur Ejakulation gespeichert. Während der Ejakulation werden die Spermatozoen durch den Samenleiter, den Ductus deferens, aus dem Nebenhoden geleitet und dem Ejakulat die Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Prostata, Samenblasen und Bulbourethraldrüsen) beigelegt. (Lippert, 2000)

### **2.1.3 Die Samenblase**

Die Glandulae seminales, auch Samenblasen oder Bläschendrüsen genannt, sind paarige Organe, die als Blindsack dem Samenleiter kurz vor dessen Eintritt in die Prostata anhängen. Sie sind etwa 5 mal 1,5 cm groß und bestehen wie der Nebenhoden aus einem einzigen unverzweigten Gang, der rund 15 cm lang und gewunden ist. Er ist innen von einer Tunica mucosa, einer Schleimhautschicht, umgeben, die sekretorische Funktionen hat. Außen um den Gang befindet sich die Tunica muscularis, die bei einer Kontraktion die Abgabe des Sekretes in den Ductus ejaculatorius bewirkt. Der Ductus ejaculatorius entsteht aus der Vereinigung des Ductus deferens mit den Ductus excretorius, den Ausführungsgängen der beiden Samenblasen. Umgeben sind die Samenblasen von der bindegewebigen Tunica adventitia. Das schwach alkalische Sekret der Bläschendrüsen (pH 7,2-7,5) macht 50 % bis 75 % des Ejakulatvolumens aus und besteht aus Fruktose, Prostaglandinen, Glutathion,  $\beta$ -Endorphin, transudierten Proteinen (z.B. Transferrin, Laktoferrin), Koagulationsproteinen (Seminogelin I und II, Fibronektin) sowie Zytokinen (IL-8, VEGF, TGF- $\beta$ ). Die Funktion dieses Sekretes besteht in der Energieversorgung der Spermien durch die Fruktose, der Koagulation des

Ejakulates durch die Koagulationsproteine und der Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation mittels der Zytokine. (Lippert, 2000)

#### **2.1.4 Die Prostata**

Die Prostata, eine kastanienförmige Drüse, die zwischen Harnblase und Beckenboden liegt, besteht aus 30 bis 50 verzweigten tubuloalveolären Einzeldrüsen, die mit 15 bis 20 Ausführungsgängen, den Ductuli prostatici, in die Harnröhre münden. Umgeben ist das sekretproduzierende Drüsengewebe von einem Stroma elasticum, bestehend aus glatter Muskulatur und Bindegewebe. Bei der Ejakulation bewirken die glatten Muskelzellen eine Kontraktion der Einzeldrüsen, so dass das Prostatasekret als erste Fraktion des Ejakulates in die Harnröhre gelangt. Die Capsula prostatica, eine straffe bindegewebige Hülle, umgibt das Drüsengewebe. Zusammengesetzt ist das schwach saure Prostatasekret (pH 6,4) aus Cholesterin, Kephalin, Zitronensäure, Spermin, Spermidin, anorganischen Ionen, vor allem Zink, dem prostata-spezifischen Antigen (PSA), transudierten Proteinen (z.B. IgA, Transferrin) und Enzymen (Laktatdehydrogenase,  $\beta$ -Glukuronidase,  $\alpha$ -Amylase, Esterase und Aminopeptidase). Wichtige Funktionen der Prostata sind die Seminolyse über seminolytische Proteine (u.a. PSA), die Bereitstellung von Zink, das für eine intakte Spermienmotilität benötigt wird, und die Speicherung der antioxidativen Zitronensäure. (Lippert, 2000)

#### **2.1.5 Die Bulbourethraldrüse**

Die beiden Glandulae bulbourethrales oder Cowper-Drüsen sind im Bereich des Musculus sphincter urethrae externus neben dem hinteren Ende des Harnröhrenschwellkörpers eingelagert. Sie bestehen aus einem verzweigten schlauchförmigen Gang, in dessen Epithel Drüsenzellen eingefügt sind. Das Sekret, das unter anderem Glykoproteine zur Hemmung der Koagulation des Ejakulates enthält, wird über 3 bis 6 cm lange Ausführungsgänge in die Harnröhre abgegeben und befeuchtet diese. (Lippert, 2000)

### **2.2 Die Spermatogenese**

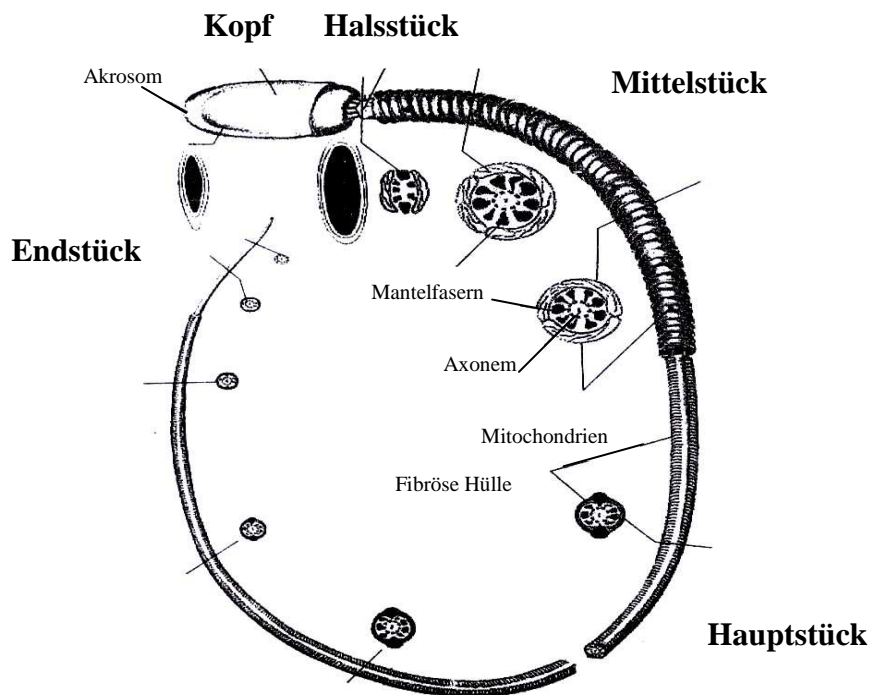
Unter dem Begriff Spermatogenese versteht man die gesamte Entwicklung der männlichen Keimzellen von Spermatogonien bis zu reifen Spermatozoen. Die Spermatogonien werden eingeteilt in sogenannte Typ A- und Typ B-Spermatogonien. Die Typ A-Spermatogonien entsprechen einer sich ständig teilenden Stammzellpopulation. Durch Mitosen entstehen aus ihnen zum Teil neue Typ A-Spermatogonien, die Stammzellen bleiben, sowie Typ B-Spermatogonien, die sich durch mitotische Teilung zu primären Spermatozyten entwickeln.

Nach einer 22-tägigen Prophase vollenden die primären Spermatozyten die erste Reifeteilung und werden so zu sekundären Spermatozyten. Diese treten ohne eine zwischengeschaltete DNA-Synthesephase in die zweite Reifeteilung ein, die wie eine normale Mitose verläuft. Es entstehen Spermatiden mit einem haploiden Chromosomensatz ( $n=23$ ). Bis zur Ausbildung der Spermatiden bleiben die Typ A-Spermatogonien über interzelluläre Brücken miteinander verbunden (Alastalo et al., 1998). Spermatogonien und Spermatiden bleiben während ihrer gesamten Entwicklung in tiefe Einbuchtungen der Sertoli-Zellen eingebettet. Funktionen der Sertoli-Zellen sind der Schutz und die Ernährung der Keimzellen.

Die Differenzierung der Spermatiden zu Spermatozoen ist die Spermiogenese, die sich aus vier Schritten zusammensetzt. Zuerst kondensiert das Kernchromatin auf 1/10 seines ursprünglichen Volumens (Fuentes-Mascorro et al., 2000), indem die Histone, um die die DNA angeordnet ist, durch Protamine ersetzt werden (Brewer et al., 2002; Meistrich et al., 2003; Lewis et al., 2004). In diesen kommt es zur Oxidation von SH-Gruppen, so dass durch Ausbildung von Disulfid-Brücken eine Stabilität des Zellkerns erreicht wird (Bedford, 1994). Im Anschluss daran entwickelt sich als Produkt des Golgi-Apparates ein Lysosom, das sich als Akrosom an der Spitze des Spermatiden-Kopfes zwischen Plasmamembran und Zellkern einfügt. Danach wird das überschüssige Zytoplasma der Spermatiden als Residualkörper abgeschnürt und von den Sertoli-Zellen phagozytiert. Als letzter Schritt folgt die Bildung des Flagellums. Hierfür ordnen sich die Mitochondrien ringförmig um den vom Zentriol ausgehenden Schwanzfaden an. Die genannten Entwicklungsschritte von der Spermatide bis zum reifen Spermium laufen nicht strikt nacheinander ab, sondern überschneiden sich. Beispielsweise beginnt die Geißelbildung bereits während der Entstehung des Akrosoms. Nach abgeschlossener Differenzierung und Elongation werden die reifen Spermatozoen durch Pulsation der Wand der Tubuli seminiferi und der Ductuli efferentes passiv in den Nebenhoden transportiert, wo sie bis zur Ejakulation verbleiben. Der gesamte Prozess der Spermatogenese dauert beim Menschen mindestens 64 Tage (Weinbauer und Nieschlag, 1999).

### **2.3 Das Spermatozoon**

Reife Spermatozoen bestehen aus einem Kopf und einem Schwanz. Der Spermienkopf enthält die genetischen Informationen in Form kondensierter DNA, das Flagellum dient in erster Linie der Fortbewegung. In Abbildung 2 ist der schematische Aufbau eines Spermiums dargestellt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Aufbaus eines Säugetierspermatozoons, modifiziert nach Fawcett (1975). Die Einteilung eines Spermiums in Kopf-, Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück ist dargestellt.

Beim Menschen ist der normomorphe Spermienkopf oval, 4-5  $\mu\text{m}$  lang und 2,5-3,5  $\mu\text{m}$  breit. Den vorderen Teil des Kopfes bildet das Akrosom, den übrigen Anteil füllt der Zellkern aus, der die hochkondensierte DNA enthält. Gebildet wird das Akrosom, das aus zwei Membranen besteht, vom Golgi-Apparat (Fawcett, 1975). Direkt unter der Plasmamembran liegt die äußere akrosomale Membran, die innere liegt der Kernmembran an. Nur bei intaktem Akrosom ist eine erfolgreiche Akrosomreaktion möglich, die für den Fertilisationsprozess unabdingbar ist (Storey, 1995).

Das menschliche Spermien-Flagellum ist 50-60  $\mu\text{m}$  lang und wird in Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück unterteilt. Der Kopf ist über die Basalplatte mit dem etwa 1  $\mu\text{m}$  langen Halsstück verbunden. Daran schließt sich das Mittelstück an, das etwa 4-6  $\mu\text{m}$  lang und 1  $\mu\text{m}$  dick ist. Im Mittelstück sind die Mitochondrien des Spermiums enthalten, die der Energieversorgung dienen. Ihm folgt das 40-50  $\mu\text{m}$  lange Hauptstück. Es ist von einer Membran umgeben, unter der die sogenannte fibröse Hülle liegt, eine Fibrillenscheide. Sie schließt sich kaudal an die mitochondriale Hülle des Mittelstücks an und besteht aus zwei längs verlaufenden Säulen, die über Querrippen miteinander verbunden sind (Eddy, 1988).

Den Abschluss des Flagellums bildet das etwa 5 µm lange Endstück. Hals-, Mittel- und Hauptstück werden zentral vom Axonem durchzogen, welches aus neun kreisförmig angeordneten Doppeltubulipaaren und einem zentralen Mikrotubulipaar besteht. Umgeben wird das Axonem von den Mantelfasern, die zwischen Hals- und Mittelstück liegen (Serres et al., 1983) und passiv-elastische Funktionen haben (Swan et al., 1980; Henkel et al., 1992). Sie dienen nicht der aktiven Beweglichkeit des Flagellums, sondern schützen es vor den massiven Scherkräften, denen die Spermien während der Ejakulation ausgesetzt sind (Baltz et al., 1990), so dass ein Abknicken oder –brechen der Flagellen verhindert wird. Darüber hinaus haben sie für die effiziente Energiekonversion im Flagellum eine eminente Bedeutung (Lindemann, 1996; Henkel et al., 2003c).

## 2.4 Zusammensetzung des Ejakulates

Das Ejakulat ist die Samenflüssigkeit des Mannes, die bei der Ejakulation freigesetzt wird. Es enthält als zelluläre Bestandteile Spermatozoen, Rundzellen (Leukozyten und Zellen der Spermatogenese) sowie in seltenen Fällen Erythrozyten. Neben den Zellen besteht das Ejakulat aus den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, also Prostata, Samenblase und Bulbourethraldrüsen. Während der Ejakulation kontrahieren zuerst die Bulbourethral-Drüsen und neutralisieren mit ihrem alkalischen Sekret den pH-Wert im Harntrakt. Anschließend kontrahieren Prostata, Nebenhoden und Ductus deferentes gleichzeitig, so dass Spermien und Prostatasekret zusammentreffen. Als letzter Bestandteil wird das Sekret der Bläschendrüse dem Ejakulat beigefügt. Kurz nach der Ejakulation sind die Spermatozoen noch nicht gleichmäßig im Ejakulat verteilt. Nach einer 15-20 minütigen Verflüssigungsphase vermischen sich alle Sekrete und es kommt zu einer gleichmäßigen Verteilung der Zellen.

**Tabelle 1:** Normwerte des Ejakulates entsprechend WHO-Leitlinien (1999).

Ejakulatvolumen	≥2,0 ml
pH-Wert	≥7,2
Spermienkonzentration	≥20 Mio/ml
Gesamte Spermienzahl	≥40 Mio
Motilität	≥50 % Spermatozoen mit Vorwärtsbeweglichkeit (WHO A + B) oder ≥25 % mit schneller progressiver Motilität (WHO A)
Morphologie	≥30 % normal geformte Spermatozoen
Vitalität	≥50 % vitale Spermatozoen (Eosin-Test)
Leukozyten	<1 Mio/ml

Tabelle 1 zeigt die WHO-Richtwerte für verschiedene Ejakulatparameter (WHO, 1999). Weiterhin besteht nach WHO (1999) eine Möglichkeit der Klassifikation hinsichtlich Spermiedichte, -motilität und -morphologie, die in Tabelle 2 dargestellt ist.

**Tabelle 2:** Nomenklatur einiger Ejakulatparameter (nach WHO, 1999).

<b>Nomenklatur der Ejakulatparameter</b>	<b>Ejakulatparameter</b>
Oligozoospermie	Spermatozoendichte $\leq 20$ Mio/ml
Asthenozoospermie	$< 50$ % Spermien mit Vorwärtsprogression (Kategorie A + B) oder $< 25$ % Spermien mit Beweglichkeit der Kategorie A
Teratozoospermie	$< 30$ % Spermien mit normaler Morphologie
Oligoasthenoteratozoospermie	Alle drei Parameter sind gestört
Azoospermie	Keine Spermien im Ejakulat
Aspermie	Kein Ejakulat

## 2.5 Die Fertilisation

Nachdem die Spermatozoen den Nebenhoden und Samenleiter passiert haben, treten sie in Kontakt mit dem Seminalplasma. Hierdurch erhalten sie zum einen ihre Beweglichkeit (Cooper, 1986), zum anderen wird zunächst über sog. „sperm-coat“-Antigene (Dekapazitationsfaktoren) die Plasmamembran stabilisiert und die Akrosomreaktion verhindert (Oliphant et al., 1985). Nach der Ejakulation in die Vagina gelangen die Spermien in den Zervikalkanal, werden überwiegend passiv durch den Uterus in die Tuben transportiert (Croxatto et al., 1978) und müssen schließlich durch Eigenbewegung verschiedene physiologische Hindernisse wie die Zervix-Mukos-Barriere, den in Richtung Uterus gerichteten Flüssigkeitsstrom in den Tuben und den ebenfalls der Bewegungsrichtung der Spermien entgegengesetzten Zilienschlag des Tubenepithels überwinden.

Als erster Schritt, der für die Befruchtung der Eizelle direkt nötig ist, erfolgt die Kapazitation der Spermien, die beginnt, nachdem die Spermien das Seminalplasma verlassen haben (Robertson et al., 1988). Man versteht darunter einen Umbauprozess der Spermienplasmamembran, der unter anderem die Akrosomreaktion ermöglicht. Für den Vorgang der Kapazitation werden Oberflächenantigene von der Zellmembran eliminiert und modifiziert (Austin, 1960). Eine Veränderung der Lipidzusammensetzung bewirkt eine modifizierte Membranfluidität (Langlais und Roberts, 1985; Yanagimachi, 1994; Visconti et al., 1998), die für die Akrosomreaktion und die Spermienbindung an die Zona pellucida

unabdingbar ist (Jaiswal et al., 1998). Die Kapazitation bewirkt eine Hypermotilität der Spermien, die sich in einem kräftigen Flagellenschlag mit seitlicher Kopfauslenkung äußert (Burkman, 1990). Eine wichtige Rolle spielt die Hypermotilität bei der mechanischen Penetration der Zona pellucida (Katz et al., 1993). Nur kapazitierte Spermien sind in der Lage, den Cumulus oophorus zu passieren (Corselli und Talbot, 1987; Cummins und Yanagimachi, 1992).

Nach der Kapazitation schließt sich durch Bindung des Spermiums an die Zona pellucida die Akrosomreaktion an. Dabei handelt es sich um einen modifizierten exozytotischen Prozess (Barros et al., 1967). Durch eine partielle Fusion zwischen der Plasmamembran des Spermatozoons und der äußeren akrosomalen Membran werden akrosomale hydrolytische Enzyme, z.B. Hyaluronidase, Akrosin und andere Proteasen, Glukuronidase und N-Acetyl-Glukosidaminidase freigesetzt. Im Anschluss an die Akrosomreaktion wird die innere akrosomale Membran exponiert und wird zur äußeren Spermienmembran (Austin und Bishop, 1958; Barros et al., 1967; Langlais und Roberts, 1985; Meizel, 1985; Yudin et al., 1988). Auf ihr verbleiben Akrosin- und Proakrosinmoleküle fest verankert, die später an die Zona pellucida binden und diese auflösen.

Die Zona pellucida ist eine aus Glykoproteinen aufgebaute Membran, die die Oozyte umgibt. Sie bildet auf molekularer Ebene die Basis zur Speziespezifität (Swenson und Dunbar, 1982; Menkveld et al., 1991) und sichert den Polyspermieblock (Wolf, 1981; Sathananthan und Trounson, 1982). Nach Wassarman (1987) besteht die Säugetierzona im Wesentlichen aus drei Glykoproteinen, die als ZP1, ZP2 und ZP3 bezeichnet werden. ZP1 ist ein Strukturprotein, ZP2 und 3 sind Bindungsproteine, über die die Spermien nach stattgefundener Akrosomreaktion an die Zona pellucida binden. Des Weiteren soll ZP3 als Induktor der Akrosomreaktion fungieren. Eine Schlüsselrolle kommt bei der Zona-Bindung den während der Akrosomreaktion auf der Spermienoberfläche exprimierten Proakrosin- und Akrosinmolekülen zu (Töpfer-Petersen und Henschen, 1987; Jones et al., 1988; Urch und Patel, 1991). Der nichtenzymatische Teil des Moleküls bindet an ZP2, wodurch die enzymatische Komponente aktiviert wird und eine lokal umschriebene Lyse der Zona bewirkt (Urch et al., 1985a, b). Fehlt Akrosin, so ist eine Fertilisation nicht möglich (Stambaugh und Buckley, 1970; Zaneveld et al., 1970; Wolff et al., 1976; Schill et al., 1981; Liu und Baker, 1993; Moore et al., 1993).



Nach abgeschlossener Akrosomreaktion und Zona-Bindung erfolgt die Fusion der Zellmembranen von männlicher und weiblicher Gamete, die Plasmogamie. Ihr schließt sich die Karyogamie (Kernfusion) an. Die zelluläre Befruchtung ist mit Ausbildung der Zygote abgeschlossen (Syngamie; Gametenverschmelzung) und es kommt zur ersten Furchungsteilung (Alberts et al., 1990).

## **2.6 Entzündungen des männlichen Genitalsystems**

Entzündungen des männlichen Genitalsystems können alle Organe des Genitaltraktes, also Hoden, Nebenhoden, Prostata, Samenblase oder auch die Urethra betreffen. Eine Entzündung liegt per definitionem dann vor, wenn die Leukozytenkonzentration im Ejakulat  $1 \times 10^6$  Mio/ml überschreitet (WHO, 1999). Inflammatorische Prozesse können die Spermienqualität und die Fertilität des Mannes entscheidend beeinflussen.

### **2.6.1 Ursachen für Entzündungen des männlichen Genitalsystems**

Entzündungen des Genitalsystems können durch Krankheitserreger verursacht werden, die entweder aus der Harnröhre zu anderen Teilen des Genitaltraktes aufsteigen, hämatogen im Rahmen einer Bakteriämie oder Virämie inflammatorische Prozesse verursachen oder lymphogen durch Entzündungen benachbarter Organe ins Genitalsystem gelangen. Dabei entstehen virale Infektionen zumeist hämatogen und betreffen den Hoden, während bakterielle Entzündungen eher ascendierend verursacht werden und häufiger Urethra, Prostata, Samenblase und Nebenhoden betreffen (Krieger, 1984). Als Auslöser für Genitaltraktsinfektionen kommen neben Bakterien und Viren auch Pilze (*Candida albicans*), Einzeller (*Trichomonas vaginalis*) und Autoimmunprozesse in Frage.

Bakterielle Infektionen sind entweder Geschlechtskrankheiten und werden durch Keime wie *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, Mykoplasmen oder Ureaplasmen verursacht oder es handelt sich um gramnegative uropathogene Keime wie *E.coli*, die im Zuge von Harnwegsinfekten in das Genitalsystem aufsteigen. Selten gelangen Bakterien durch hämatogene Streuung oder lymphogen (z.B. bei einer Proktitis) in den Genitaltrakt (Ikeuchi et al., 1991).

Häufigster Erreger viraler inflammatorischer Prozesse ist das Mumpsvirus (Krieger, 1984), daneben können auch das Epstein-Barr-Virus (Ralston et al., 1960; Weiner, 1997), das Varizella-Zoster-Virus (Liu et al., 1994) oder Coxsackie-Viren (Minzter, 1963) eine

Entzündung verursachen. Aufsteigende virale Infektionen durch das Herpes Typ II-Virus kommen ebenfalls vor und betreffen in erster Linie Urethra, Prostata und Samenblase.

Autoimmun bedingte Entzündungen entstehen dann, wenn Gewebe des Genitaltraktes, die sonst keinen Kontakt zu Immunzellen haben, mit diesen in Berührung kommen. Das kann traumatisch, beispielsweise auch im Rahmen von Operationen (Suominen, 1995), oder durch Entzündungen geschehen. In beiden Fällen wird die Blut-Hoden-Schranke unterbrochen, so dass Zellen des Immunsystems Kontakt zu den Spermatozoen erhalten. Da physiologischerweise Blut und Hodengewebe strikt voneinander getrennt sind, ist es auch nicht erforderlich, dass Immunzellen, die Spermienantigene erkennen, eliminiert werden. Entsteht nun eine Verbindung zwischen Blut und Hodengewebe, werden die Spermienantigene als körperfremd registriert und eine Antikörperbildung wird eingeleitet. Auf diese Weise kommt es zum Untergang von Spermatozoen (Schuppe und Meinhardt, 2005).

## **2.6.2 Arten von Entzündungen des männlichen Genitalsystems**

### **2.6.2.1 Orchitis**

Die Orchitis, die Hodenentzündung, ist in der Regel eine hämatogene Erkrankung des Hodens, meist viraler Genese. Seltener tritt eine bakterielle Orchitis auf, die aufsteigend vom Nebenhoden auf den Hoden übergreifen oder in Ausnahmefällen hämatogen übertragen werden kann. Sie kann nach Harnwegsinfekten auftreten oder sexuell übertragen werden bzw. im Rahmen einer Bakteriämie entstehen (Hermansen et al., 1980). Auch autoimmune Entzündungen des Hodens sind möglich (Schuppe und Meinhardt, 2005), insbesondere dann, wenn die Blut-Hoden-Schranke durchbrochen wurde und so Hodengewebe Kontakt zu immunkompetenten Zellen hatte. Eine derartige Situation entsteht beispielsweise durch Inguinal-Hernien-Operationen (Suominen, 1995). Folge dessen ist die Produktion von Auto-Antikörpern gegen Spermatozoen, die dadurch zugrunde gehen (Yavetz et al., 1991). Typisches Beispiel für eine Hodenentzündung ist die die Mumpsorchitis im Rahmen einer Parotitis epidemica (Krieger et al., 1984). Sie tritt im Allgemeinen nur dann auf, wenn geschlechtsreife Männer sich mit dem Virus infizieren, nicht jedoch beim Kind (Beard et al., 1977). Andere Virusorchitiden können jedoch auch bei Kindern vorkommen. Als Erreger kommen hier, ebenso wie beim Erwachsenen, Coxsackie-Viren, Varizella-Zoster-Viren und Epstein-Barr-Viren in Betracht. Mögliche Folge einer beidseitigen Virusorchitis ist eine

irreversible Schädigung des Keimepithels mit Hodenatrophie und Azoospermie (Bertschat und Alexander, 1981). Die Testosteronproduktion in den Leydigzellen kann ebenfalls beeinträchtigt sein (Aiman et al., 1980).

Klinisch findet sich ein deutlich vergrößerter, druckschmerzhafter Hoden. Meist ist die Entzündung nur unilateral. Bei akuten Verläufen zeigen die Patienten deutliche Allgemeinsymptome wie Fieber und einen reduzierten Allgemeinzustand, bei der subakuten Form fehlen dies Anzeichen, so dass differenzialdiagnostisch ein Hodentumor abzugrenzen ist. Eine Therapie ist lediglich symptomatisch möglich und besteht in einer Hochlagerung und Kühlung des Skrotums, Antiphlogistikagabe und eventuell einer systemischen Cortisonzufuhr. (Merkle, 1997)

### **2.6.2.2 Epididymitis**

Die Epididymitis, die Nebenhodenentzündung, ist eine Krankheit, die durch aufsteigende Bakterien aus dem Harntrakt über den Ductus deferens entsteht (Somekh et al., 2004). Häufigster Erreger bei Männern vor dem 35. Lebensjahr ist Chlamydia trachomatis, gefolgt von Neisseria gonorrhoeae (Krieger, 1984; Stav et al, 2003). Bei älteren Männern sind meist gramnegative Keime nachweisbar (Krieger, 1984). Das Risiko, an einer Epididymitis zu erkranken, steigt bei vorhandenen Anomalien des Vas deferens oder des Nebenhodens (Krieger, 1984). Typischerweise tritt die Epididymitis als häufigste Genitaltraktentzündungen (Krieger, 1984) nicht vor der Pubertät auf.

Klinisch äußert sich die akute Nebenhodenentzündung in einer plötzlich einsetzenden, sehr schmerzhaften Schwellung des Skrotums mit Rötung und Überwärmung. Eine Ausstrahlung der Schmerzen in den Bauchraum ist möglich, der Nebenhoden ist als wulstförmige Schwellung palpabel. Die Patienten befinden sich in einem reduzierten Allgemeinzustand mit hohem Fieber. Differentialdiagnostisch abzugrenzen ist die Hodentorsion. Therapeutische Maßnahmen bestehen in einer Hochlagerung des Skrotums, Bettruhe, Kühlung, Antiphlogistika- und Antibiotikagabe.

Neben der akuten Epididymitis gibt es eine chronische Verlaufsform. Sie entsteht aus der akuten Nebenhodenentzündung und äußert sich in einem verdickten, verhärteten, leicht druckschmerzhaften Nebenhoden ohne Allgemeinsymptome. Therapeutisch ist die

Beseitigung einer eventuell bestehenden Anomalie des Vas deferens anzustreben, bei Erfolglosigkeit die Epididymektomie. (Merkle, 1997)

### **2.6.2.3 Prostatitis**

Eine Prostatitis (Entzündung der Prostata) entsteht meist als aufsteigende Infektion über die Urethra. Auch eine hämatogene Streuung bei gleichzeitiger Entzündung anderer parenchymatöser Organe oder eine lymphogene Genese im Rahmen einer Proktitis sind möglich. Prädisponierend wirken Harnröhrenstrikturen, -divertikel und Prostataadenome (Vega, 2002; Batstone und Doble, 2003). Differentialdiagnostisch abzugrenzen sind das Prostatakarzinom und die psychosomatische Prostatopathie. Mögliche Komplikation ist eine Abszedierung, die bei unzureichender Therapie in einer Urosepsis münden kann. Es ist zu differenzieren zwischen akuter und chronischer Prostatitis.

Klinisch imponiert die akute Prostatitis durch eine Pollakisurie, imperativen Harndrang, Algurie, Dammschmerz, Schmerzen beim Stuhlgang und einen reduzierten Allgemeinzustand mit hohem Fieber. Die Palpation ist sehr schmerzhaft. Therapieoptionen erstrecken sich über eine Antibiose nach Antibiogramm, eine Spasmolytikaanalgesie bis eventuell zur vorübergehenden suprapubischen Katheteranlage.

Bei der chronischen Prostatitis ist der klinische Befund weniger ausgeprägt. Es kommt zu ständigen Dysurien, imperativem Harndrang, Druckgefühl im Damm, Parästhesien, Störungen der Sexualfunktion und fakultativ zur Hämospemie. Die Palpation ist wenig bis gar nicht druckschmerzhaft, oft ist die Konsistenz der Prostata verändert. Therapeutisch kommen eine Spasmoanalgesie, eine Stuhlgangregulierung, eine Balneotherapie und bei positiver Kultur eine Antibiose (bevorzugt mit einem hochdosierten Gyrasehemmer) in Frage. (Merkle, 1997)

### **2.6.2.4 Vesikulitis**

Selten kommt die Vesikulitis, die Entzündung der Samenblase, isoliert vor. Meist ist sie assoziiert mit einer Urethritis und Prostatitis. Die Infektion ist in der Regel bakterieller Natur, häufigster Erreger ist Chlamydia trachomatis (Krishnan und Heal, 1991; Furuya et al., 2004). Eine Kombination aus Urethritis, Prostatitis und Vesikulitis wird auch als männliche Adnexitis (MAGI = male accessory gland infection) bezeichnet. Oft ist in diesem Zusammenhang auch der Nebenhoden von der Entzündung betroffen (Krishnan und Heal, 1991; Furuya et al., 2004). Eine Entzündung der Samenblase findet sich gehäuft bei Patienten

mit Divertikeln im Vas deferens (Dunnick et al., 1982). Klinisch imponiert die Vesikulitis durch einen imperativen Harndrang, einen abgeschwächten Urinstrahl, Algurie und ein Druckgefühl im Dammbereich, das in die Leistenregion ausstrahlen kann. Therapiert wird die Entzündung antibiotisch (bei Chlamydien als Erreger mit Gyrasehemmern, Tetracyclinen oder Erythromycin) und spasmolytikaanalgetisch. (Merkle, 1997)

#### **2.6.2.5 Urethritis**

Die Urethritiden (Entzündungen der Harnröhre) werden eingeteilt in gonorrhoische und nichtgonorrhoische Formen. In jedem Fall liegt eine sexuell übertragbare Krankheit vor. Erreger der nichtgonorrhoischen Urethritis können Chlamydia trachomatis, Mykoplasmen und Ureaplasmen oder Herpesviren sein, seltener Trichomonaden oder *Candida albicans* (Schmidt et al., 1988; Bradshaw et al., 2006). Durch Anlage einer Bakterienkultur mit anschließender Gramfärbung der Bakterien erfolgt die Erregeridentifikation. Gonokokken sind dabei gramnegativ, ebenso die anderen möglichen Erreger. Klinisch manifestiert sich die Urethritis mit einer Algurie und Ausfluss, der bei der gonorrhoischen Urethritis eitrig, bei den anderen Formen eher glasig ist. Therapiert werden bakteriellen Infektionen antibiotisch (Gyrasehemmer, Tetrazykline oder Erythromycin), Soor mit Nystatin und Viren lokal oder systemisch mit Aciclovir. Eine Mitbehandlung des Partners sollte erfolgen. (Merkle, 1997)

#### **2.6.3 Auswirkungen von Entzündungen des Genitaltraktes auf die Spermienqualität**

Viele Studien belegen, dass Genitaltraktentzündungen die Ejakulatqualität nachhaltig beeinträchtigen. So ist bei Patienten mit inflammatorischen Prozessen des Genitalsystems die Spermiedichte reduziert (Berger et al., 1982; Wolff et al., 1990; Eggert-Kruse et al., 1992; Gonzales et al., 1992), die Spermienmotilität vermindert (Wolff et al., 1990; Eggert-Kruse et al., 1992; Gonzales et al., 1992), die Spermatozoenmorphologie beeinträchtigt (Eggert-Kruse et al., 1992; Gonzales et al., 1992) und die DNA-Fragmentation der Spermatozoen tendentiell erhöht (Henkel et al., 2003). Weiterhin ist die Penetration der Zona pellucida durch die Spermien gestört (Berger et al., 1983; Maruyama et al., 1985), was nach einer antibiotischen Therapie in der Regel reversibel ist (Berger et al., 1983). Auch die Hyperaktivierung der Spermatozoen, die für die Kapazitation und Akrosomreaktion erforderlich ist, findet nicht in dem Maße statt, wie in Ejakulaten ohne Infektion (Chan et al., 1994). Ursache für die Schädigung der Spermatozoen durch Entzündungen sind Stoffwechselprodukte, Enzyme und Mediatoren aktivierter Leukozyten, die sich gehäuft in inflammatorisch veränderten

Ejakulaten finden. Dazu gehören ROS, Proteasen und Zytokine, auf deren Bedeutung in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird.

### **2.6.3.1 Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die Spermienqualität**

Im Rahmen der immunologischen Abwehr von Krankheitserregern produzieren die Leukozyten unter anderem reaktive Sauerstoffspezies (ROS). ROS sind hochreaktive Verbindungen wie  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{O}^{2-}$  und  $\cdot\text{OH}$ , die durch ihre Instabilität innerhalb einiger Nano- bis Millisekunden zerfallen und andere Verbindungen in ihrer unmittelbaren Umgebung oxidieren (Pawlak et al., 1998). Sie werden durch eine NADPH-Oxidase der Granulozyten generiert (Weiss, 1989). Physiologischerweise werden auf diese Weise Bakterienmembranen zerstört (respiratory burst) und eine Ausbreitung und Vermehrung potentieller Krankheitserreger im Makroorganismus verhindert (Johnston, 1978).

Da die Plasmamembranen menschlicher Spermatozoen einen hohen Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren wie beispielsweise Docosahexansäure enthalten (Darin-Bennett et al., 1976; Aitken und Clarkson, 1987; Alvarez et al., 1987), deren Doppelbindungen leicht oxidiert werden können, sind sie durch ROS besonders gefährdet (Jones et al., 1979; Alvarez et al., 1987; Aitken et al., 1989). Folge des Einwirkens von Sauerstoffradikalen auf die Spermatozoen können eine reduzierte Motilität (Jones et al., 1979; Alvarez et al., 1987; Kovalski et al., 1992; Krausz et al., 1994; Plante et al., 1994; de Lamirande und Gagnon, 1992), Vitalität (Jones et al., 1979; Alvarez et al., 1987; Kovalski et al., 1992; Krausz et al., 1994; Plante et al., 1994; de Lamirande und Gagnon, 1992), Morphologie und Funktionalität hinsichtlich Akrosomreaktion, Kapazitation und Zona-Bindung sein (Aitken und Mark, 1989). Reaktive Sauerstoffspezies, speziell Wasserstoffperoxid, können auch die Plasmamembranen der Spermien durchdringen und Strukturen im Inneren der Spermatozoen schädigen. Insbesondere ein erhöhter Anteil an Spermien mit fragmentierter DNA bei hohen ROS-Konzentrationen reduziert die Fertilität (Kodama et al., 1997; Motchnik und Podda, 1997). Es wird angenommen, dass die DNA-Fragmentation der Spermatozoen in erster Linie ROS-induziert ist (Kodama et al., 1997; Lopes et al., 1998b; Irvine et al., 2000). Neben einer reduzierten Fertilität werden bei einem hohen Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentation eine erhöhte Frühabortrate (Trasler et al., 1985, 1986, 1987; Qiu et al., 1995) und vermehrte Missbildungen der Kinder, die aus solchen Ejakulaten entstehen, beobachtet (Ahmadi und Ng, 1999).

Im Seminalplasma können zumindest niedrige ROS-Level durch antioxidative Substanzen wie Vitamin C, Zink, Superoxiddismutase (Kobayashi et al., 1991; Nonogaki et al., 1992), Transferrin, Spermin (Lovaas und Carlin, 1991), Laktoferrin, Albumin und Harnsäure (Mann und Lutwak-Mann, 1981) weitgehend eliminiert werden (Schopf et al., 1984; Bouvet et al., 1990; Aitken et al., 1995a). Erst unphysiologisch hohe ROS-Konzentrationen oder die Abwesenheit des Seminalplasmas, wie es beispielsweise in Hoden und Nebenhoden der Fall ist, können nicht mehr abgefangen werden (Smith et al., 1996). Grundsätzlich müssen alle Entzündungen des männlichen Genitaltraktes als schädlich für die Spermienfunktion angesehen werden (Ochsendorf und Podda, 1999).

Neben der ROS-Produktion durch die Leukozyten können auch die Spermatozoen selbst Sauerstoffradikale produzieren (Aitken et al., 1992 und 1996; Krausz et al., 1992; Henkel et al., 1997; Whittington und Ford, 1999). Allerdings ist die granulozytäre ROS-Produktion etwa tausendmal höher, als die der Spermien (de Lamirande und Gagnon, 1995). Über eine NADPH-Oxidase im Mittelstück der Spermatozoenmembran (Aitken et al., 1997; Leclerc et al., 1997) oder über eine mitochondriale NADPH-abhängige Oxidoreduktase der Atmungskette (Gavella und Lipovac, 1992) erfolgt die ROS-Bildung in den Spermatozoen. Die physiologische Funktion der von den Spermien gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies besteht vermutlich zum einen in der Induktion der Kapazitation (de Lamirande et al., 1998), zum anderen scheinen ROS beim Erlangen der hyperaktiven Motilität, die zum Eintritt des Spermiums in die Zona pellucida notwendig ist, eine Rolle zu spielen (Leclerc et al., 1997).

#### **2.6.3.2 Einfluss von Proteasen auf die Spermienqualität**

Proteasen sind proteolytische Enzyme der Granulozyten. Sie dienen dem Abbau phagozytierter Fremdkörper und Mikroorganismen. Von einem Granulozyten aufgenommene Bakterien werden von primären Lysosomen umschlossen, die dadurch zu sekundären Lysosomen werden. In diesen werden die Bakterien durch Proteasen abgebaut, es kommt zur Bildung tertiärer Lysosomen. Auf diese Weise entsteht ein wirkungsvoller Mechanismus zur Abwehr von Krankheitserregern (Malech und Gallin, 1987). Dabei befinden sich in den verschiedenen Lysosomen verschiedene Enzyme. Primäre Lysosomen enthalten vor allem Peroxidase und Elastase, sekundäre Lysosomen Kollagenasen, Lysozyme, Vitamin-B<sub>12</sub>-bindendes Protein sowie Laktoferrin und tertiäre Lysosomen Gelatinase (Malech und Gallin, 1987).

Neben der intrazellulären Lyse von Fremdkörpern können die Proteasen auch eine extrazelluläre Wirkung entfalten. Die Lysosomen können durch Fusion mit der Zellmembran der Granulozyten exozytotisch abgegeben werden (Malech und Gallin, 1987). Extrazellulär werden sie normalerweise durch  $\alpha_1$ -Protease-Inhibitor und  $\alpha_2$ -Makroglobulin inaktiviert (Malech und Gallin, 1987; Kramer et al., 1992). Bei einem genetisch bedingten Mangel an inaktivierenden Enzymen oder einem Überschuss an Proteasen im Extrazellulärraum kommt es zu Gewebeschädigungen (Weiss, 1989). Im Rahmen von Genitaltraktentzündungen sind davon in erster Linie die Spermatozoen betroffen. Vorherrschende Protease ist die Elastase. Der Anteil inaktivierender Enzyme variiert dabei interindividuell sehr stark (Kramer et al., 1992), so dass unterschiedlich hohe Granulozytenkonzentrationen im Ejakulat verschieden gut toleriert werden.

### **2.6.3.3 Einfluss von Zytokinen auf die Spermienqualität**

Zytokine sind Mediatoren, die von vielen Zellen produziert und freigesetzt werden können, beispielsweise von Lymphozyten, Makrophagen und Epithelzellen. Sie dienen im Rahmen von Entzündungen der Chemotaxis und Aktivierung weiterer Zellen des Immunsystems. Weiterhin induzieren sie Akute-Phase-Proteine und regulieren die Hämatopoese sowie die Tumorprogression und -regression. Ihre Wirkung entfalten Zytokine über Zelloberflächenrezeptoren. Man teilt die Zytokine ein in Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumornekrosefaktoren (TNF) und hämatopoetische Wachstumsfaktoren.

Im Hinblick auf Genitaltraktentzündungen wichtige Zytokine sind  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-6}$  und  $\text{IL-8}$ . Zytokine allgemein beeinträchtigen die Spermienmotilität und das Fertilisationspotential (Hill et al., 1987).  $\text{TNF-}\alpha$  wird von Monozyten sowie natürlichen Killerzellen produziert. Es wirkt toxisch auf Tumorzellen und induziert die Zytokinproduktion durch andere, an Entzündungsreaktionen beteiligte, Zellen. Bei Infektionen des Genitalsystems entfaltet es eine hemmende Wirkung auf die Spermatozoenmotilität (Hill et al., 1987; Eisermann et al., 1989). Weiterhin induziert  $\text{TNF-}\alpha$  die Lipidperoxidation durch von den Spermatozoen selbst gebildete reaktive Sauerstoffspezies. Dadurch wirkt es potentiell schädigend auf die Spermatozoen (Buch et al., 1994). Denselben Effekt hat auch  $\text{IL-1}\alpha$  (Buch et al., 1994), das von Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen und natürlichen Killerzellen gebildet wird. Seine physiologische Funktion besteht in einer Induktion der Lymphozytenproliferation, Chemotaxis sowie der Synthese von Prostaglandinen und Akute-Phase-Proteinen. Hemmend auf die Spermienmotilität wirkt neben  $\text{TNF-}\alpha$  auch  $\text{IFN-}\gamma$  (Hill et



al., 1987). Es wird von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen gebildet und wirkt antiviral. Weiterhin findet sich IL-6 gehäuft in Ejakulaten von Männern mit Genitaltraktentzündung. Es wird von verschiedenen Zellen einschließlich Makrophagen synthetisiert und produziert Akute-Phase-Proteine. Des Weiteren induziert es die Teilung und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten (Kishimoto et al., 1992). IL-6 reduziert die Spermienmotilität und das Fertilisationspotential des Ejakulates (Naz und Kaplan, 1994). Ein weiteres Zytokin, dessen Konzentration in Ejakulaten mit Leukozytospemie erhöht ist, ist IL-8 (Shimoya et al., 1993; Comhaire et al., 1994). Es wird von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten produziert (Bazzoni et al., 1991) und dient der Chemotaxis von Granulozyten (Schröder, 1992; Yoshimura et al., 1987).

#### **2.6.4 Folgen von Entzündungen des Genitalsystems für die männliche Fertilität**

Zwischen 10% und 20% der Männer mit unerfülltem Kinderwunsch weisen eine Leukozytospemie auf, so dass Entzündungen des Genitalsystems als fertilitätsbeeinträchtigende Faktoren angesehen werden müssen (Wolff, 1995). Verschiedene Studien beweisen, dass der Anteil an Männern mit Leukozytospemie unter ungewollt kinderlosen Patienten höher ist, als bei Gesunden (Auroux et al., 1985; Wolff und Anderson, 1988; Wang et al., 1994). Weiterhin belegen Untersuchungen, dass die Erfolgsrate bei in-vitro Fertilisationen mit steigender Leukozytenkonzentration im Ejakulat abnimmt (Cohen et al., 1985; Talbert et al., 1987). Eine zunehmende Infertilität wird ebenso bei Patienten mit erhöhter ROS-Produktion im Ejakulat gefunden (Aitken et al., 1989; Iwasaki und Gagnon, 1992), wie bei Patienten mit einem hohen Anteil an Spermien mit fragmentierter DNA (Bianchi et al., 1993 und 1996; Manicardi et al., 1995 und 1998; Sun et al., 1997; Lopes et al., 1998b; Sharma et al., 2004). Beide Faktoren sind mögliche Folgen einer Infektion des Genitalsystems (Henkel et al., 2003a). Ebenfalls eine entscheidende Rolle im Hinblick auf eine erfolgreiche Fertilisation spielt der Anteil normomorpher Spermien am Ejakulat. Mit sinkendem Anteil normomorpher Spermien, was unter anderem entzündungsbedingt sein kann (Eggert-Kruse et al., 1992; Gonzales et al., 1992), fällt auch die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft der Partnerin (Kruger et al., 1988; Oehninger et al., 1988; Toner et al., 1995). Genitaltraktentzündungen mit einer Leukozytospemie und deren beschriebenen Folgen müssen folglich als fertilitätsmindernd angesehen werden.

### 3. Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Beschreibung von Auswirkungen, die Entzündungen des männlichen Genitalsystems auf verschiedene Spermatozoenparameter haben. Hierfür sollte der Einfluss entzündungstypischer Parameter wie Leukozytenkonzentration, ROS-Produktion und DNA-Fragmentation auf Spermatozoendichte, -motilität, -vitalität und -morphologie sowie den pH-Wert untersucht werden. Wie zahlreiche andere Studien zeigen, nimmt bei einer Genitaltraktentzündung die Ejakulatqualität (Barrat et al., 1990; Wolff et al., 1990; Eggert-Kruse et al., 1992; Gonzales et al., 1992) und auch die Fertilität (Cohen et al., 1985; Talbert et al., 1987) deutlich ab. Zum einen sollte diese Tatsache in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, zum anderen sollte jedoch auch untersucht werden, ob die Ejakulatqualität davon abhängig ist, an welcher Stelle im männlichen Genitalsystem die Entzündung lokalisiert ist. Hintergrund für diese Fragestellung war die Annahme, dass bei einer Entzündung in Bereichen, die frühe Stadien der Spermienreifung betreffen, stärkere Defizite auftreten müssten, als bei Entzündungen in Organen, bei denen die bereits ausgereiften Spermien nur eine relativ kurze Kontaktzeit zu den Entzündungszellen haben. Bekannt ist, dass Entzündungen, die die Sertoli-Zell-Funktion beeinträchtigen, also vor allem Orchitiden, in einem erhöhten Anteil morphologisch geschädigter Spermien mit erhöhter intrinsischer ROS-Produktion resultieren (Bayasgalan et al., 2004; Gouletsou et al., 2004). Folgen sind eine erhöhte DNA-Fragmentation der Spermatozoen und eine reduzierte Spermienmotilität (Henkel et al., 2005). Andererseits ist bekannt, dass  $H_2O_2$  als eine der reaktiven Sauerstoffspezies, die auch von Leukozyten produziert wird, in der Lage ist, Zellmembranen zu durchdringen. Es wirkt sich direkt negativ auf die DNA-Integrität und die Spermienmotilität aus und erhöht die intrinsische ROS-Produktion (Henkel et al., 2005), die den schädigenden Einfluss noch verstärkt. Diese Wirkung von  $H_2O_2$  ist unabhängig vom Reifungsstadium der Spermien und kann auch experimentell durch Zugabe von  $H_2O_2$  zu Ejakulaten belegt werden (Ramos und Wetzels, 2001; Giwercman et al., 2003). Es stellt sich die Frage, ob eine frühe inflammatorische Schädigung der Spermienreifung mit folgenden morphologische Defiziten und hoher intrinsischer ROS-Produktion die Spermienqualität stärker beeinträchtigt, als Entzündungsprozesse, die die bereits ausgereiften Spermien betreffen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die verschiedenen Ejakulatparameter zwischen den Patientengruppen mit Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis und MAGI verglichen sowie eine Unterteilung in frühe (Orchitis und Epididymitis) und späte (Prostatitis, Vesikulitis und Urethritis) Genitaltraktentzündung vorgenommen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien

Bei den Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, solche mit der höchsten Reinheit, pro Analysisi (p.A.), verwendet.

### 4.2 Ejakulate und Ejakulatanalyse

Für die Untersuchungen wurden Ejakulate von 49 Patienten der ambulanten Sprechstunde der Klinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena sowie von 39 Patienten der andrologischen Sprechstunde der Hautklinik der FSU Jena verwendet.

Die Gewinnung aller untersuchten Ejakulate erfolgte jeweils nach einer sexuellen Karenzzeit von 3 bis 5 Tagen durch Masturbation in einen Kunststoffbecher (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Nach Verflüssigung des Ejakulates in einem Inkubator (Heraeus, Kendro, Langenselbold, Deutschland) bei 37°C wurde die Spermatozoendichte in einem Aliquot von 10 µl Ejakulat durch visuelle Auszählung der Spermatozoen in einer Zählkammer (Spermometer, Assistant) unter dem Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei einer 40-fachen Vergrößerung im Phasenkontrast ermittelt.

Ebenfalls mikroskopisch wurde die Motilität bestimmt, wobei die Spermatozoen nach WHO-Richtlinien (WHO, 1999) klassifiziert wurden:

WHO A: schnelle progressive Beweglichkeit ( $\geq 20 \mu\text{m/s}$  bei 25°C)

WHO B: träge progressive Beweglichkeit

WHO C: nicht progressive Beweglichkeit ( $< 5 \mu\text{m/s}$ )

WHO D: Immotilität ( $0 \mu\text{m/s}$ )

Die Vitalität der Spermien wurde mittels Eosin-Supravitalfärbung ermittelt. Dabei wurden 10 µl in einer 0,5 %igen Eosin-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) in destilliertem Wasser mit 10 µl Ejakulat auf einem Objektträger vermischt, mit einem Deckgläschen bedeckt und nach 30 Minuten Inkubation der Anteil nicht-rotgefärbter Spermienköpfe ausgezählt. Tote Spermatozoen nehmen den Farbstoff auf und färben sich entsprechend rot an, während die vitalen Spermien farblos bleiben.

Weiterhin wurden im Rahmen der Ejakulatanalyse das Ejakulat-Volumen, der pH-Wert mittels Indikatorpapier (Merck), die Konsistenz, Farbe, Geruch des Ejakulates sowie die Zeit zur Liquefizierung des Ejakulates nach dessen Gewinnung ermittelt.

Bei Patienten mit klinischen Zeichen einer Genitaltraktentzündung (Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis, Urethritis, MAGI) wurde deren Lokalisation vermerkt und mit in die Auswertung einbezogen. Unter MAGI wurden Ejakulate der Patienten zusammengefasst, die laut WHO-Definition eine Leukozytospemie von  $>1 \times 10^6$  Leukozyten/ml aufwiesen, die aber keiner der anderen Entzündungsgruppen eindeutig zugeordnet werden konnten. Patienten, bei denen per definitionem eine Entzündung ausgeschlossen werden konnte, dienten als Kontrolle.

#### 4.3 HTF-Medium

**Tabelle 3:** Zusammensetzung des HTF-Mediums, Hersteller der verwendeten Chemikalien, sowie die eingewogene Menge pro Liter A. dest.

Chemikalie	Hersteller	Masse	Konzentration
NaCl	Merck	5,94 g	101,6 mM
KCl	Merck	0,35 g	4,69 mM
CaCl <sub>2</sub> X 2 H <sub>2</sub> O	Merck	0,301 g	2,04 mM
MgSO <sub>4</sub> X 7 H <sub>2</sub> O	Merck	0,05 g	0,2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	0,05 g	0,37 mM
Phenolrot	Merck	0,005 g	
NaHCO <sub>3</sub>	Merck	2,1 g	25,0 mM
Glucose (wasserfrei)	Merck	0,5 g	2,78 mM
Na-Pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	0,036 g	0,33 mM
Na-Lactat (60 % Sirup)	Sigma-Aldrich	3,9982 ml	21,4 mM
HEPES	Sigma-Aldrich	5,206 g	20,0 mM

Zum Aufnehmen von Spermatozoen nach dem Entfernen des Seminalplasmas sowie zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies wurde ein Medium, das in seiner

Ionenzusammensetzung der menschlichen Tubenflüssigkeit (**H**uman **T**ubular **F**luid Medium; HTF-Medium) (Quinn et al., 1985) nachempfunden ist, verwendet. Die Zusammensetzung des HTF-Mediums ist in Tabelle 3 dargestellt. Nach der Herstellung des Mediums wurde es in 50 ml-Röhrchen (Cellstar®, Bio-One, Greiner, Frickenhausen, Deutschland) abgefüllt und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

Zur weiteren Verwendung, zum Beispiel zum Waschen der Spermatozoen für die Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies im Ejakulat, wurde jeweils ein Röhrchen mit HTF-Medium aufgetaut, 2 ml entnommen und die verbleibenden 48 ml mit 2 ml 20 % HSA (Humanes Serumalbumin; Humanalbumin, 20 % Octalbin®, Octapharma GmbH, Langenfeld, Deutschland) aufgefüllt (HTF-HSA-Medium). Die Endkonzentration HSA im HTF-HSA-Medium war 1 % (entspricht 0,01 g HSA/ml).

#### **4.4 Bestimmung der Spermatozoenmorphologie**

Die Spermatozoenmorphologie ist ein wichtiger Parameter, von dem nicht nur Spermienfunktionen wie zum Beispiel die Bindung der Spermien an die Zona pellucida (Menkveld et al., 1991) oder die Akrosomreaktion (Menkveld et al., 2003a) abhängig sind, sondern sie ist auch ein wichtiger Parameter für die Prädiktion von Fertilisation und Schwangerschaft im Rahmen der assistierten Reproduktion (Kruger et al., 1988; Francavilla et al., 1990; Menkveld et al., 1990; Kruger und Coetzee, 1999). Wegen dieser großen Bedeutung wurde im Rahmen dieser Arbeit die Spermatozoenmorphologie mit drei verschiedenen Färbemethoden bestimmt.

##### **4.4.1 Shorr-Färbung**

Die Shorr-Färbung dient der Beurteilung der Morphologie der Spermatozoen. Sie wurde in Anlehnung an das Protokoll von Shorr (1941) durchgeführt.

Hierzu wurden zunächst 100 µl Ejakulat 1:5 mit PBS (Oxoid limited, Basingstoke, Hampshire, England) verdünnt, und 10 Minuten bei 400 X g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 100 µl frischem PBS resuspendiert. Anschließend wurde ein Ausstrich angefertigt, der luftgetrocknet wurde. Der Objektträger wurde für 10 Minuten in 100 % Ethanol (Merck) fixiert, dann 1 Minute in 70 % Ethanol. Danach wurde der Objektträger für 10 Minuten und 30 Sekunden in Hämalun-Lösung nach Mayer (Merck) gestellt. Überschüssige Farblösung wurde 3 Minuten lang unter

fließendem Wasser abgespült. Im Anschluss daran wurde das Präparat für jeweils 10 Sekunden erst in 70 % und dann 95 % Ethanol getaucht. Die so behandelte Probe wurde schließlich eine Minute in Shorr'sche Farblösung (Fluka-Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) gestellt und dann in Ethanol gewaschen. Das Präparat wurde zunächst zweimal für 10 Sekunden in 95 % Ethanol und dann dreimal in 100 % Ethanol getaucht. Danach wurde der Objektträger zweimal 5 Minuten in Roti Histol® (Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) gestellt, bevor er nach Auftragen eines Tropfens Eindeckmittel (Histofluid, Superior, Marienfeld, Deutschland) mit einem Deckgläschen abgedeckt wurde.

Abschließend wurde das Präparat nach den folgenden Parametern differenziert:

Anteil der Spermatozoen mit normaler Morphologie

Anteil der Spermatozoen mit Kopfdefekten

Anteil der Spermatozoen mit Mittelstückdefekten

Anteil der Spermatozoen mit Schwanzdefekten

Die Differenzierung erfolgte nach strikten Kriterien in Anlehnung an Menkveld et al. (1990).

#### **4.4.2 Papanicolaou-Färbung**

Die Färbung nach Papanicolaou wurde ebenfalls durchgeführt, um die Morphologie der Spermatozoen beurteilen zu können. Sie erfolgte nach dem WHO-Protokoll von 1999.

Hierzu wurden zunächst 100 µl Ejakulat 1:5 mit PBS (Oxoid) verdünnt, und 10 Minuten bei 400 X g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 100 µl frischem PBS resuspendiert. Danach wurde ein Ausstrich angefertigt und luftgetrocknet. Auf dem Objektträger wurde die Probe fixiert, indem sie für mindestens 10 Minuten in 100 % Methanol (Merck) gestellt wurde. Das Präparat konnte nun in einer absteigenden Ethanolreihe (Merck) gewaschen werden. Der Objektträger wurde zunächst zehnmal in 80 % Ethanol, dann zehnmal in 70 % Ethanol, dann zehnmal in 50 % Ethanol und schließlich zehnmal in destilliertes Wasser getaucht. Anschließend wurde der Ausstrich 15 Minuten in Harris Hämatoxylin Farblösung (Merck) gestellt. Der überschüssige Farbstoff wurde 3-5 Minuten unter fließendem Wasser abgespült, bis der Objektträger klar war. Danach wurde die Probe zweimal in 0,5 % HCl (VWR™ International Prolabo, Fontenay sous Bois, Frankreich) getaucht. Hierfür wurde 1 ml konzentrierte HCl in 200 ml destilliertem Wasser verdünnt. Im Anschluss daran wurde das Präparat 5 Minuten lang unter fließendem Wasser abgespült. Der Objektträger wurde dann für eine weitere Minute in „Scott's Water“ gestellt.

„Scott`s Water“ wurde hergestellt, indem 20 g  $\text{MgSO}_4$  (Merck) und 2 g  $\text{NaHCO}_3$  (Merck) in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst wurden. Nachdem die Probe wieder aus dem „Scott`s Water“ entfernt worden war, wurde sie für 1 bis 5 Minuten unter fließendem Wasser abgespült. Anschließend wurde sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt. Der Objektträger wurde erst zehnmal in 50 % Ethanol, im Folgenden zehnmal in 70 % Ethanol, dann zehnmal in 80 % Ethanol und schließlich zehnmal in 95 % Ethanol getaucht. Danach wurde die Probe für 15 Minuten in Orange G6 (Merck) gestellt. Nach diesen 15 Minuten wurde das Präparat zehnmal in 95 % Ethanol getaucht, um dann für 15 Minuten in EA 50 (Merck) inkubiert zu werden. Anschließend wurde die Probe in 95 % Ethanol gewaschen, indem sie fünfzehnmal darin eingetaucht wurde. Danach wurde der Objektträger erst fünfmal in 100 % Methanol und dann fünfmal in Methanol mit Roti-Histol® (Mischungsverhältnis 1:1) getaucht, um schließlich für 20 Minuten in Roti-Histol® gestellt werden zu können. Abschließend wurde ein Tropfen Eindeckmittel (Histofluid, Superior) aufgetragen und das Präparat mit einem Deckgläschen bedeckt.

Die Spermien wurden nach den folgenden Parametern differenziert:

- Anteil der Spermatozoen mit normaler Morphologie
- Anteil der Spermatozoen mit Kopfdefekten
- Anteil der Spermatozoen mit Mittelstückdefekten
- Anteil der Spermatozoen mit Schwanzdefekten

Die Differenzierung erfolgte nach strikten Kriterien in Anlehnung an Menkveld et al. (1990).

#### **4.4.3 Testsimplet-Färbung**

Die dritte Spermatozoen-Färbung, die zur Beurteilung der Morphologie eingesetzt wurde, war die Färbung mittels Testsimplets. Hierfür wurden auf einen Testsimplet-Objektträger (Waldeck, Münster, Deutschland) 10  $\mu\text{l}$  Ejakulat gegeben und das Präparat mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit erfolgte, wie bei den Färbungen nach Papanicolaou und Shorr auch, die Differenzierung des Ejakulates nach strikten Kriterien in Anlehnung an Menkveld et al. (1990) nach folgenden Parametern:

- Anteil der Spermatozoen mit normaler Morphologie
- Anteil der Spermatozoen mit Kopfdefekten
- Anteil der Spermatozoen mit Mittelstückdefekten
- Anteil der Spermatozoen mit Schwanzdefekten

#### **4.5 Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)**

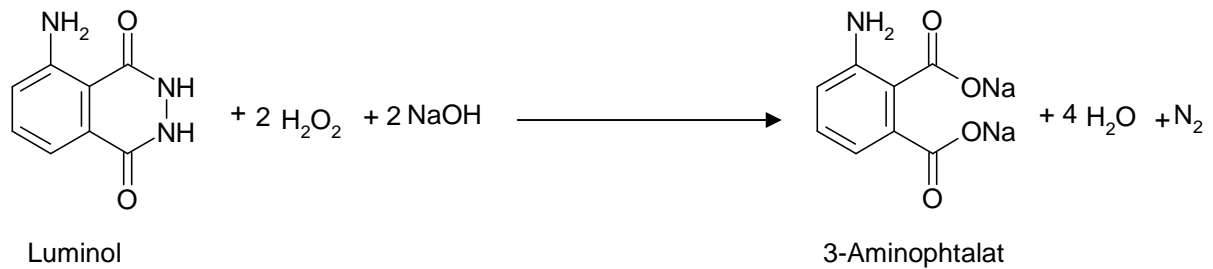
Fertilisation und Schwangerschaft sind abhängig von einer Reihe funktioneller Spermatozoenparameter, die von der aktiven Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies im Ejakulat wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Superoxidanionen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) oder Hydroxylradikalen ( $\cdot\text{OH}$ ) beeinflusst werden (Aitken, 1989; Aitken et al., 1991; Krausz et al., 1994; de Lamirande et al., 1997b; Lopes et al., 1998b). Solche hochgradig reaktiven Verbindungen mit Halbwertszeiten im Nano- bis Millisekundenbereich wirken stark oxidierend und werden physiologischerweise in allen Körperzellen produziert. Quellen der ROS-Produktion im Ejakulat sind zu einem geringen Teil die Spermatozoen, hauptsächlich aber aktivierte Leukozyten, die etwa tausendmal mehr ROS produzieren, als Spermatozoen (Plante et al., 1994; Whittington et al., 1999; Henkel et al., 2003b). Die Leukozyten sind durch eine massive ROS-Produktion in der Lage, in den Körper eingedrungene Mikroorganismen abzuwehren. Potentielle Krankheitserreger werden hierbei nicht selektiv geschädigt, sondern alle Zellen können angegriffen werden. Dazu gehören insbesondere auch die Spermatozoen, da sie in ihrer Plasmamembran einen hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere an Docosahexansäure (Darin-Bennet et al., 1976), enthalten, die leicht oxidiert werden kann.

##### **4.5.1 Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies im Ejakulat**

Um den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf verschiedene Spermatozoenparameter wie beispielsweise die Spermatozoenmotilität, -vitalität, -morphologie oder DNA-Fragmentation untersuchen zu können, wurde der Anteil der ROS im Ejakulat in Anlehnung an das Protokoll von Henkel et al. (1997) bestimmt. Da der Anteil der ROS-Produktion durch die Leukozyten etwa tausendmal größer ist, als der der Spermatozoen (de Lamirande und Gagnon, 1995), kann die Gesamtmenge an Sauerstoffradikalen annähernd mit der extrinsischen leukozytären ROS-Produktion gleichgesetzt werden.

Zur Bestimmung der extrinsischen ROS-Produktion wurde Luminol (Sigma-Aldrich), ein gelber kristalliner Feststoff, der bei Oxidation Energie in Form von Licht abgeben kann, verwendet. Wenn Luminol mit Sauerstoffradikalen in Verbindung kommt, wird es oxidiert und zerfällt in das energetisch angeregte 3-Aminophtalat, das dann unter Emission von blauem Licht (Wellenlänge 420 nm) in einen energetisch günstigeren Normalzustand übergeht. Die Lichtausbeute beträgt dabei 0,01 Einstein/mol. Die beschriebene Reaktion ist in Abbildung 3 dargestellt.





**Abbildung 3:** Reaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid und Natronlauge zu 3-Aminophthalat. Das dabei emittierte Licht (0,01 Einstein/Mol) kann mit einem Luminometer detektiert werden.

Für die Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies im Ejakulat wurden 400 µl verflüssigtes Ejakulat 1:5 mit HTF-HSA verdünnt. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 300 X g zentrifugiert (Zentrifuge: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet mit 400 µl frischem HTF-HSA-Medium resuspendiert. Je 100 µl des so gewaschenen Ejakulates wurden in ein Messröhrchen (Sarstedt) gegeben. Von jedem Ejakulat wurden 2 bis 3 Proben gemessen, als 0-Kontrolle wurden bei jeder Messung 2 bis 3 Röhrchen mit je 100 µl HTF-HSA mitgeführt. Die für die Messung benötigte Luminol-Lösung wurde folgendermaßen angesetzt: 20 mg Luminol (4 mM) wurden in 1411 µl DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich) vorgelöst und anschließend in 26,8 ml HTF-Medium aufgenommen. Die Lösung wurde in einen Messbecher gefüllt, der mit Aluminium-Folie umwickelt wurde. In den Becher mit der Lösung wurde eine Injektorpumpe gehängt, welche die Lösung mit Luminol in dem Messbecher ansaugte. Über ein Schlauchsystem wurden in jedes Röhrchen mit Ejakulat, das sich in dem Messgerät befand, 100 µl Luminol überführt. In dem Gerät konnte die Reaktion des Luminols mit den anwesenden Sauerstoffradikalen mittels Lichtemission quantifiziert werden. Das für die Messung verwendete Messgerät war der Lumat LB 9501/16 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland), der wie folgt eingestellt wurde:

- Messtemperatur: 37°C
- Messzeit der Einzelmessungen: 2 Sekunden
- Gesamtmesszeit: 20 Minuten
- Anzahl der Probenröhrchen: 10
- zugeführtes Volumen Luminol: 100 µl

Für spätere Berechnungen wurde ein Mittelwert aus zwei bis drei Einzelmessungen gebildet. Mit Hilfe der gewonnenen Daten wurden die Counts pro  $10^6$  vitale Spermien (bestimmt mittels Eosin-Test) pro 20 Minuten nach folgender Formel berechnet:

**Formel:**

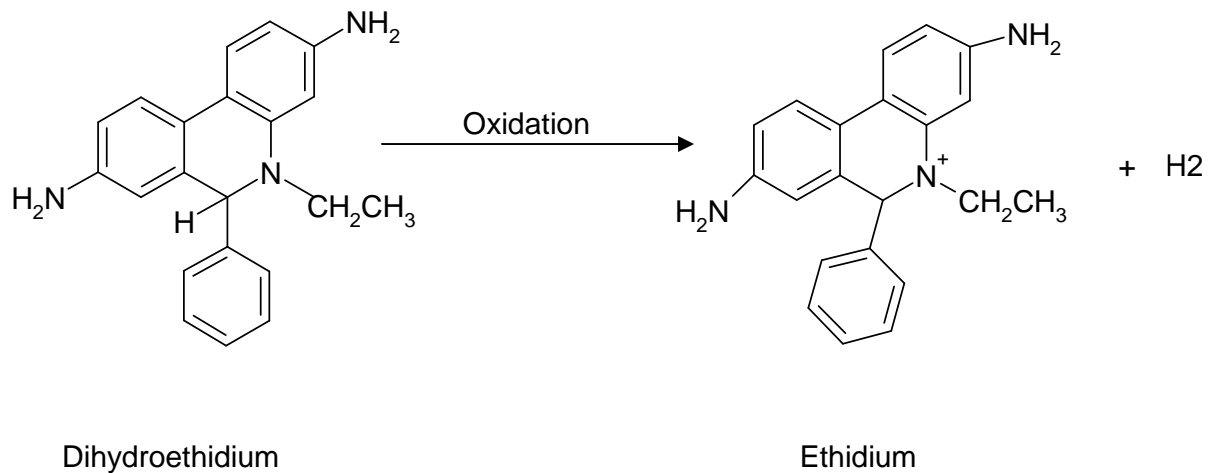
$$X = \sum(\text{Counts der Einzelmessungen}) \times 1000 / (\text{Spermatozoenzelldichte} \times \text{Vitalität})$$

**4.5.2 Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies in Spermatozoen**

Um unterscheiden zu können, welchen Einfluss die von den Spermatozoen selbst produzierten ROS und welchen Einfluss die gesamten reaktiven Sauerstoffspezies im Ejakulat (von Spermatozoen und Leukozyten produziert) haben, wurde die ROS-Produktion in den Spermatozoen selber gemessen. Hierfür wurde der Fluoreszenzfarbstoff Dihydroethidium verwendet, der im reduzierten Zustand ein blauer Farbstoff ist, der sich im Zytoplasma anreichert. Wird er zu Ethidium oxidiert (zum Beispiel durch ROS), kommt es zu einem Farbumschlag von blau nach rot. Das rote Ethidium interkaliert mit der DNA der Spermatozoen, was die Rot-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 620 nm nach Anregung mit UV-Licht (Wellenlänge 280 nm) verstärkt. Hingegen bindet der blaue Farbstoff nicht an die DNA. Abbildung 4 zeigt die Reaktion von Dihydroethidium zu Ethidium.

Die Bestimmung der intrinsischen ROS-Produktion wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde eine 20 µM Dihydroethidium-Lösung hergestellt, indem 1 mg DHE (Dihydroethidium) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) in 0,16 ml DMSO gelöst wurde und anschließend 158,57 ml PBS (Oxoid) zugegeben wurden. In Eppendorf-Tubes wurde die Lösung zu 100 µl aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Zur ROS-Messung wurde jeweils ein Tube mit DHE aufgetaut. Anschließend wurden 100 µl Ejakulat 1:4 mit PBS verdünnt. Das Gemisch wurde bei 400 X g 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand anschließend abpipettiert. Zu dem verbleibenden Pellet wurden 180 µl PBS und 20 µl Dihydroethidium zugegeben. Danach wurde die Probe bei 37°C für 30 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Nach der halbstündigen Inkubationszeit wurden 10 µl Suspension auf einem Objektträger mit einem Deckgläschen bedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet (Rothe und Valet, 1990; Henkel et al., 2003a).

Bestimmt wurde der Anteil der Spermatozoen, die rot fluoreszierten. Dabei wurde zwischen Spermatozoen mit Zytoplasmarest und solchen ohne Zytoplasmarest im Mittelstück unterschieden.



**Abbildung 4:** Oxidation von Dihydroethidium zu Ethidium.

#### 4.6 Bestimmung des Anteils Peroxidase-positiver Zellen

Eine Leukozytospemie ( $>1 \times 10^6$  Leukozyten/ml Ejakulat; WHO, 1999) ist ein Indikator für eine Infektion des männlichen Genitaltraktes, die die Spermatozoonfunktion beeinträchtigt und die Fertilität vermindert (Wolff, 1995; Comhaire et al., 1999). Zur Erfassung einer Leukozytospemie kann die Peroxidasefärbung in Anlehnung an Endtz (1974) verwendet werden. Die meisten Leukozyten, die sich im Ejakulat befinden, sind polymorphkernige Granulozyten, die im Zytoplasma reichlich Peroxidase enthalten, welche durch eine histochemische Färbung nachgewiesen werden kann.

Zunächst wurde die Lösung zum Peroxidasenachweis angesetzt, indem zu 10 ml o-Toluidin (3,6 g/0,9 NaCl ad 200,0 ml; ACROS Organics, New Jersey, USA) 0,02 ml Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Wasserstoffperoxid-Lösung 3 %, Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland) zugegeben wurden. Anschließend wurden 950  $\mu\text{l}$  der Lösung mit 50  $\mu\text{l}$  Ejakulat vermischt und bei  $37^\circ\text{C}$  für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden 100 Gruppenquadrate in einer Zählkammer (Spermometer, Assistent) ausgezählt. Es imponierten die Peroxidase-positiven Zellen dabei als braun gefärbte Zellen. Die gezählten Leukozyten dividiert durch 10 entsprach der Leukozytenzahl  $\times 10^6$  pro Milliliter Ejakulat.

#### 4.7 Nachweis der DNA-Fragmentation in Spermatozoen mittels TUNEL-Assay

Die DNA-Fragmentation in Spermatozoen ist ein wichtiger Parameter, der die männliche Fertilität beeinflusst. Mit zunehmender Schädigung der DNA nimmt die Fertilität ab und die Rate ungewollter Kinderlosigkeit im Rahmen von IVF (in-vitro Fertilisation) (Sun et al., 1997; Morris et al., 2002; Henkel et al., 2004), ICSI (intrazytoplasmatische Spermien-Injektion) (Lopes et al., 1998a) und IUI (intrauterine Insemination) (Duran et al., 2002) zu.

Mögliche Ursachen für DNA-Fragmentation sind apoptotische Prozesse (Sakkas et al., 1999a) oder das Vorhandensein von ROS im Ejakulat, entweder aus den Spermatozoen selbst (Henkel et al., 1997) oder aus Leukozyten (Aitken und West, 1990).

Mittels des TUNEL-Assays (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUDP-biotin endlabeling) wird das Maß der DNA-Fragmentation der Spermatozoen bestimmt. Das Enzym TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) bewirkt eine Bindung von Fluorescein-12-dUDP an die freien 3'-Enden der fragmentierten DNA. Je mehr freie 3'-Enden vorhanden sind (also je stärker die DNA fragmentiert ist), umso mehr Fluorescein-12-dUDP wird gebunden und umso stärker fluoreszieren auch die Spermatozoen.

Zur Durchführung des TUNEL-Assays wurde ein Kit der Firma Promega (Madison, USA) verwendet und 100 µl der Ejakulatprobe nach Henkel et al. (2003) zunächst 1:5 mit PBS (Oxoid) verdünnt und 10 Minuten bei 400 X g und Raumtemperatur zentrifugiert. Es wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in 100 µl frischem PBS resuspendiert. Danach wurde mit 20 µl Spermien suspension ein Ausstrich auf einem Superfrost-Objektträger angefertigt (Menzel-Gläser®, Braunschweig, Deutschland), der luftgetrocknet wurde. Der trockene Ausstrich wurde mit frisch vorbereiteter, kalter (4°C) 4 % Formaldehydlösung (VWR) 25 Minuten in der Kälte fixiert. Danach wurde der Objektträger für 5 Minuten bei Raumtemperatur in frischer PBS gewaschen und die Probe anschließend für 5 Minuten in 0,2 % Triton X-100 (Merck) permeabilisiert. Im Folgenden wurde der Objektträger zweimal für jeweils 5 Minuten in frischer PBS bei Raumtemperatur gespült und die überschüssige Flüssigkeit schließlich abgeklopft oder -getupft. Auf den trockenen Objektträger wurden 100 µl Equilibrierungspuffer (TUNEL Kit) gegeben; der Objektträger wurde so 5 bis 10 Minuten inkubiert. Während dieser Zeit wurde der Inkubationspuffer vorbereitet. Zu 45 µl Equilibrierungspuffer wurden 20 µl Nukleotidmix (TUNEL Kit) gegeben, der zuvor im Kühlschrank aufgetaut worden war, und 1 µl TdT-Enzyme (TUNEL Kit). Nachdem das Präparat 5 bis 10 Minuten mit dem Equilibrierungspuffer inkubiert worden war, wurde das Areal um die Probe mit Filterpapier getrocknet und anschließend mit 20 µl Inkubationspuffer versehen. Die Zellen durften dabei nicht austrocknen. Der Objektträger wurde mit einem Plastikdeckgläschen (Promega) bedeckt und für 60 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde die 20 X SSC-Lösung (TUNEL Kit) zehnfach mit destilliertem Wasser verdünnt, die 2 %ige Lösung in ein Coplin Jar gefüllt, das Deckgläschen vom Objektträger entfernt und dieser für 15 Minuten bei Raumtemperatur in die Lösung

gestellt. Anschließend wurde die Probe dreimal 5 Minuten bei Raumtemperatur in PBS gewaschen, um nicht-inkorporiertes Fluorescein-12-UDP zu entfernen. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit Filterpapier entfernt, ein Tropfen Anti-Fade-Solution (Slow Fade® Light Antifade Kit; Molecular Probes) wurde auf den Objektträger gegeben und die Probe unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) analysiert.

Es wurde der Anteil der Spermazoen, die grün fluoreszierten, gezählt, ein Maß dafür, wie ausgeprägt die DNA-Fragmentation im Ejakulat war.

#### **4.8 Fotodokumentation**

Eine Fotodokumentation wurde von den Morphologiefärbungen nach Papanicolaou, Shorr und den Testsimplen, vom TUNEL-Assay sowie der intrinsischen ROS-Bestimmung durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Farbfilm ISO 400/27°C (Kodak, Stuttgart, Deutschland) mit einer Aufsetzkamera MC63 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 100-facher Vergrößerung.

#### **4.9 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Statistik-Programms (Medcalc®, Version 8.1, MedCalc Software, Mariakerke, Belgien). Es wurden zunächst die Normalverteilungen der Daten mittels Kolmogorov-Smirnov-Test berechnet. Zusammenhänge zwischen verschiedenen Spermatozoenparametern wurden bei normalverteilten Daten mittels Korrelationskoeffizienten und bei nicht normalverteilten Daten mittels Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Eine graphische Darstellung erfolgte durch Regressionsgeraden. Die Vergleiche der verschiedenen Spermatozoenparameter zwischen den einzelnen Entzündungen wurden bei normalverteilten Daten mit dem T-Test für ungepaarte Proben, bei nicht normalverteilten Daten mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt.

## **5. Ergebnisse**

## 5.1 Spermienmorphologie

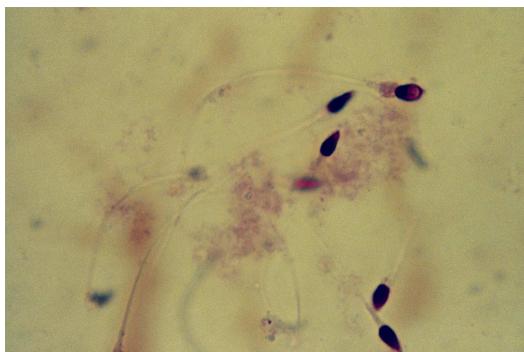
Untersucht wurde der Einfluss der Spermienmorphologie auf verschiedene andere Spermatozoenparameter. Dabei wurde zwischen den Anteilen normomorpher Spermien, Spermien mit Kopf-, Mittelstück und Schwanzdefekten jeweils nach den Färbungen nach Papanicolaou, Shorr und mittels Testsimplets unterschieden. Es wurde der Zusammenhang mit Spermiedichte, -motilität, -vitalität, pH-Wert des Ejakulates, Leukozytenkonzentration im Ejakulat, ROS-Produktion und DNA-Fragmentation betrachtet. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel dargestellt, die Abbildungen 5 bis 7 zeigen die Morphologiefärbungen nach Papanicolaou, Shorr sowie mittels Testsimplets.



**Abbildung 5:** Nach Papanicolaou-Färbung gefärbte Spermatozoen.

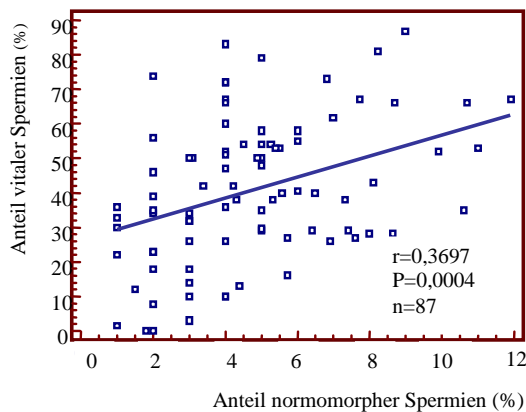


**Abbildung 6:** Nach Shorr-Färbung gefärbte Spermatozoen.

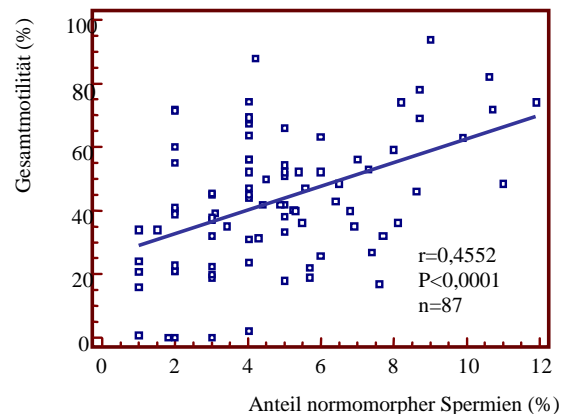


**Abbildung 7:** Nach Testsimplet-Färbung gefärbte Spermatozoen.

### 5.1.1 Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und pH-Wert, Spermiedichte,

**-motilität sowie -vitalität**

**Abbildung 8:** Zusammenhang zwischen dem Anteil normomorpher Spermien nach Papanicolaou-Färbung und dem Anteil vitaler Spermien im Ejakulat.



**Abbildung 9:** Zusammenhang zwischen dem Anteil normomorpher Spermien nach Papanicolaou-Färbung und der Gesamtmotilität der Spermatozoen.

**Tabelle 4:** Zusammenhänge zwischen den morphologischen Spermatozoenparametern nach Papanicolaou-Färbung und dem Anteil vitaler Spermien.

	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
Normomorph	0,3697	<b>0,0004</b>	87
Kopfdeformität	0,0048	0,965	87
Mittelstückdeformität	-0,2129	<b>0,0478</b>	87
Schwanzdeformität	-0,418	<b>0,0001</b>	87

Zwischen den verschiedenen morphologischen Spermatozoenparametern und der Spermiedichte zeigten sich ebensowenig signifikante Korrelationen, wie zwischen der Spermienmorphologie und dem pH-Wert des Ejakulates. Hingegen bestanden deutliche Zusammenhänge zwischen Morphologie und Vitalität. Bei einem hohen Anteil normomorpher Spermien war auch der Anteil vitaler Spermien hoch (Papanicolaou-Färbung:  $r=0,3697$ ;  $P=0,0004$ ;  $n=87$ ; Abbildung 8; Shorr-Färbung:  $r=0,2675$ ;  $P=0,0139$ ;  $n=84$ ). Lediglich bei der Testsimplet-Färbung war diese Korrelation nicht signifikant ( $r=0,1676$ ;  $P=0,1185$ ;  $n=88$ ). Tabelle 4 zeigt die entsprechenden Ergebnisse für die Papanicolaou-Färbung.

Signifikante Zusammenhänge wurden ebenfalls zwischen den morphologischen Parametern und der Spermienmotilität deutlich. Je höher der Anteil normomorpher Spermien war, umso höher war auch der Anteil schnell progressiv beweglichen Spermien (Papanicolaou-Färbung:

$r=2,598$ ;  $P=0,00151$ ;  $n=87$ ; Shorr-Färbung:  $r=0,326$ ;  $P=0,0025$ ;  $n=84$ ; Testsimplet-Färbung:  $r=0,2731$ ;  $P=0,01$ ;  $n=88$ ) sowie die Gesamtmotilität (Papanicolaou-Färbung:  $r=0,4552$ ;  $P<0,0001$ ;  $n=87$ ; Shorr-Färbung:  $r=0,3666$ ;  $P=0,0006$ ;  $n=84$ ), wobei häufig die höchste negative Korrelation zwischen dem Anteil an Schwanzdeformitäten und der Motilität bestand. Wesentliche Zusammenhänge zwischen morphologischen Parametern nach Papanicolaou-Färbung und Motilität sind in Tabelle 5 bis 8 zusammengefasst, Abbildung 9 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Anteil normomorpher Spermien nach Papanicolaou-Färbung und der Gesamtmotilität der Spermatozoen.

**Tabelle 5:** Zusammenhänge zwischen morphologischen Spermatozoenparametern nach Papanicolaou-Färbung und dem Anteil schnell progressiv beweglicher Spermatozoen (WHO A).

	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
Normomorph	0,2598	<b>0,00151</b>	87
Kopfdeformität	-0,1444	0,1822	87
Mittelstückdeformität	-0,2435	0,23	87
Schwanzdeformität	-0,192	0,0755	87

**Tabelle 6:** Zusammenhänge zwischen morphologischen Spermatozoenparametern nach Papanicolaou-Färbung und dem Anteil langsam progressiv beweglicher Spermatozoen (WHO B).

	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
Normomorph	0,3899	<b>0,0002</b>	87
Kopfdeformität	-0,0329	0,7726	87
Mittelstückdeformität	-0,1274	0,2395	87
Schwanzdeformität	-0,453	<b>&lt;0,0001</b>	87

**Tabelle 7:** Zusammenhänge zwischen morphologischen Spermatozoenparametern nach Papanicolaou-Färbung und dem Anteil progressiv beweglicher Spermatozoen (WHO A+B).

	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
Normomorph	0,4479	<b>&lt;0,0001</b>	87
Kopfdeformität	-0,1164	0,2828	87
Mittelstückdeformität	-0,2483	<b>0,0204</b>	87
Schwanzdeformität	-0,457	<b>&lt;0,0001</b>	87

**Tabelle 8:** Zusammenhänge zwischen morphologischen Spermatozoenparametern nach Papanicolaou-Färbung und dem Anteil beweglicher Spermatozoen (WHO A+B+C).



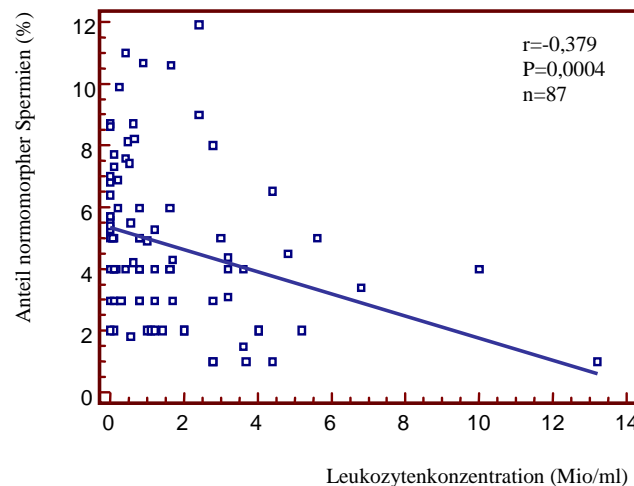
	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
Normomorph	0,4552	<b>&lt;0,0001</b>	87
Kopfdeformität	-0,1364	0,2077	87
Mittelstückdeformität	-0,2631	<b>0,0138</b>	87
Schwanzdeformität	-0,452	<b>0,0001</b>	87

### 5.1.2 Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und Leukozytenkonzentration des Ejakulates

Für alle 3 Färbemethoden zeigten sich signifikante Zusammenhänge zwischen der Leukozytenkonzentration und dem Anteil normomorpher Spermien (Papanicolaou-Färbung:  $r=-0,379$ ;  $P=0,0004$ ;  $n=87$ ; Shorr-Färbung:  $r=-0,352$ ;  $P=0,0014$ ;  $n=84$ ; Testsimplet-Färbung:  $r=-0,264$ ;  $P=0,0139$ ;  $n=88$ ). Mit ansteigenden Leukozytenzahlen nahm der Anteil normomorpher Spermatozoen ab (Tabelle 9). Am deutlichsten zeigte sich dieser Sachverhalt in der Färbung nach Papanicolaou, am wenigsten ausgeprägt war er in der Färbung mit den Testsimplets. In Abbildung 10 ist die Korrelation zwischen Leukozytendichte und dem Anteil normomorpher Spermien am Beispiel der Papanicolaou-Färbung dargestellt. Des Weiteren wurde ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der Leukozytendichte und dem Anteil an Spermatozoen mit Kopfdeformitäten deutlich, allerdings nur nach der sehr strikten und international anerkannten Papanicolaou-Färbung ( $r=0,215$ ;  $P=0,0457$ ;  $n=87$ ) (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Zusammenhänge zwischen der Leukozytenkonzentration im Ejakulat und den verschiedenen morphologischen Parametern nach Papanicolaou-Färbung.

	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
Normomorph	-0,379	<b>0,0004</b>	87
Kopfdeformität	0,215	<b>0,0457</b>	87
Mittelstückdeformität	0,058	0,5936	87
Schwanzdeformität	0,026	0,8106	87

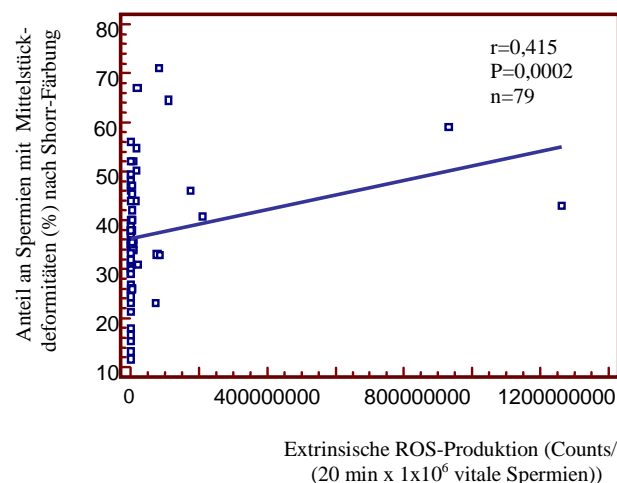


**Abbildung 10:** Korrelation zwischen der Leukozytenkonzentration im Ejakulat und dem Anteil normomorpher Spermien nach Papanicolaou-Färbung.

### 5.1.3 Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und ROS-Produktion

In diesem Kapitel wurden die Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und ROS-Produktion betrachtet. Dabei wurde zwischen extrinsischer (leukozytärer) und intrinsischer (durch die Spermatozoen selbst) ROS-Produktion unterschieden.

#### 5.1.3.1 Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und extrinsischer ROS-Produktion



**Abbildung 11:** Zusammenhang zwischen extrinsischer ROS-Produktion und dem Anteil an Spermatozoen mit Mittelstückdeformitäten nach Shorr-Färbung.

Die leukozytäre ROS-Produktion wurde zur Spermienmorphologie nach Färbung nach Papanicolaou, Shorr sowie mittels Testsimplents in Beziehung gesetzt. Dabei ergaben sich signifikant positive Zusammenhänge zwischen der extrinsischen ROS-Produktion und dem Anteil an Spermatozoen mit Mittelstückdeformitäten für alle drei Färbemethoden

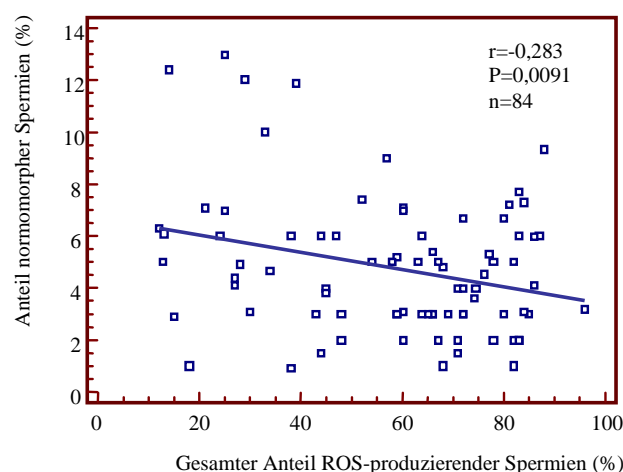
(Papanicolaou-Färbung:  $r=0,29$ ;  $P=0,0096$ ;  $n=81$ ; Shorr-Färbung:  $r=0,415$ ;  $P=0,0002$ ;  $n=79$ ; Testsimplet-Färbung:  $r=0,257$ ;  $P=0,0214$ ;  $n=81$ ). Die Ergebnisse für die Papanicolaou-Färbung sind in Tabelle 10 dargestellt. Für die Shorr-Färbung zeigte sich die beste Korrelation ( $r=0,415$ ;  $P=0,0002$ ;  $n=79$ ), was Abbildung 11 verdeutlicht. Zwischen extrinsischer ROS-Produktion und anderen morphologischen Parametern konnten keine signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden.

**Tabelle 10:** Zusammenhänge zwischen der extrinsischen ROS-Produktion im Ejakulat und den verschiedenen morphologischen Spermatozoenparametern nach Papanicolaou-Färbung.

	<b>r</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
Normomorph	-0,027	0,8097	81
Kopfdeformität	-0,023	0,8384	81
Mittelstückdeformität	0,29	<b>0,0096</b>	81
Schwanzdeformität	0,024	0,8272	81

### 5.1.3.2 Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und intrinsischer ROS-Produktion

Es wurden die Zusammenhänge zwischen der gesamten intrinsischer ROS-Produktion sowie der intrinsischen ROS-Produktion in Spermatozoen mit bzw. ohne Zytoplasmarest im Mittelstück und der Spermienmorphologie nach Färbung nach Papanicolaou, Shorr und Testsimplets ermittelt.



**Abbildung 12:** Zusammenhang zwischen dem gesamten Anteil (Spermien mit und ohne Zytoplasmarest) ROS-produzierender Spermien und dem Anteil normomorpher Spermien am Ejakulat nach Shorr-Färbung.

Für die gesamte intrinsische ROS-Produktion ergaben sich signifikant negative Zusammenhänge mit dem Anteil normomorpher Spermien (Papanicolaou-Färbung:  $r=-0,276$ ;  $P=0,0097$ ;  $n=87$ ; Shorr-Färbung:  $r=-0,283$ ;  $P=0,0091$ ;  $n=84$ ; Testsimplet-Färbung:  $r=-0,233$ ;  $P=0,0291$ ;  $n=88$ ) sowie signifikant positive Zusammenhänge mit dem Anteil an Spermatozoen mit Kopfdeformitäten (Papanicolaou-Färbung:  $r=0,3077$ ;  $P=0,0037$ ;  $n=87$ ; Shorr-Färbung:  $r=0,357$ ;  $P=0,0009$ ;  $n=84$ ; Testsimplet-Färbung:  $r=0,2871$ ;  $P=0,0067$ ;  $n=88$ ), jeweils bei allen drei Färbemethoden. Die entsprechenden Ergebnisse für die Papanicolaou-Färbung sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Der Zusammenhang zwischen gesamter intrinsischer ROS-Produktion und dem Anteil normomorpher Spermien nach Shorr-Färbung ist beispielhaft in Abbildung 12 dargestellt.

Die Korrelationen zwischen dem Anteil ROS-produzierender Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück mit den verschiedenen morphologischen Parametern nach Papanicolaou-Färbung zeigt Tabelle 12. Es fand sich dabei ein signifikant positiver Zusammenhang mit dem Anteil an Spermien mit Schwanzdeformitäten für die Färbungen nach Papanicolaou ( $r=0,257$ ;  $P=0,0173$ ;  $n=87$ ) und Shorr ( $r=0,306$ ;  $P=0,0053$ ;  $n=84$ ) sowie mit dem Anteil an Spermien mit Mittelstückdeformitäten nach Papanicolaou-Färbung ( $r=0,303$ ;  $P=0,005$ ;  $n=87$ ), nicht jedoch für die Färbung mit Testsimplets.

Die Zusammenhänge zwischen dem Anteil ROS-produzierender Spermien ohne Zytoplasmarest im Mittelstück und den verschiedenen morphologischen Parametern nach Papanicolaou-Färbung sind in Tabelle 13 dargestellt. Es bestanden dabei signifikant negative Zusammenhänge mit dem Anteil normomorpher Spermien im Ejakulat (Papanicolaou-Färbung:  $r=-0,3417$ ;  $P=0,0013$ ;  $n=86$ ; Shorr-Färbung:  $r=-0,235$ ;  $P=0,0325$ ;  $n=83$ ; Testsimplet-Färbung:  $r=-0,219$ ;  $P=0,0428$ ;  $n=86$ ) sowie signifikant positive Korrelationen mit dem Anteil an Spermatozoen mit Kopfdeformitäten (Papanicolaou-Färbung:  $r=0,3791$ ;  $P=0,0003$ ;  $n=86$ ; Shorr-Färbung:  $r=0,3647$ ;  $P=0,0007$ ;  $n=83$ ; Testsimplet-Färbung:  $r=0,3023$ ;  $P=0,0047$ ;  $n=86$ ).

**Tabelle 11:** Zusammenhänge zwischen dem gesamten Anteil (Spermien mit und ohne Zytoplasmarest) ROS-produzierender Spermatozoen im Ejakulat und der Spermatozoenmorphologie nach Papanicolaou-Färbung.

	<b>r</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
Normomorph	-0,276	<b>0,0097</b>	87
Kopfdeformität	0,3077	<b>0,0037</b>	87
Mittelstückdeformität	-0,183	0,0891	87
Schwanzdeformität	-0,036	0,7379	87

**Tabelle 12:** Zusammenhänge zwischen dem Anteil ROS-produzierender Spermatozoen mit Zytoplasmarest im Ejakulat und der Spermatozoenmorphologie nach Papanicolaou-Färbung.

	<b>r</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
Normomorph	0,019	0,8627	87
Kopfdeformität	-0,046	0,6666	87
Mittelstückdeformität	0,303	<b>0,005</b>	87
Schwanzdeformität	0,257	<b>0,0173</b>	87

**Tabelle 13:** Zusammenhänge zwischen dem Anteil ROS-produzierender Spermatozoen ohne Zytoplasmarest im Ejakulat und der Spermatozoenmorphologie nach Papanicolaou-Färbung.

	<b>r</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
Normomorph	-0,3417	<b>0,0013</b>	86
Kopfdeformität	0,3791	<b>0,0003</b>	86
Mittelstückdeformität	-0,2362	<b>0,0286</b>	86
Schwanzdeformität	-0,137	0,2080	86

#### 5.1.4 Zusammenhänge zwischen Spermienmorphologie und DNA-Fragmentation der Spermatozoen

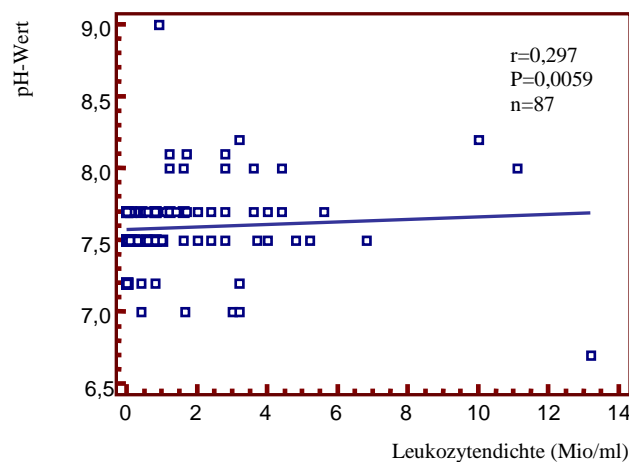
Signifikante Korrelationen zeigten sich zwischen der DNA-Fragmentation und dem Anteil an Spermien mit Schwanzdeformitäten in den Färbungen nach Shorr ( $r=0,2264$ ;  $P=0,0384$ ;  $n=84$ ) und mittels Testsimplets ( $r=0,223$ ;  $P=0,0385$ ;  $n=87$ ). Tendentiell wurde der Anteil normomorpher Spermien mit zunehmender DNA-Fragmentation (Shorr:  $r=-0,2102$ ;  $P=0,0549$ ;  $n=84$ ) geringer. Die entsprechenden Korrelationen für die Papanicolaou-Färbung sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tabelle 14:** Zusammenhänge zwischen dem Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentation und verschiedenen morphologischen Spermatozoenparametern nach Papanicolaou-Färbung.

	<b>r</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
Normomorph	-0,1728	0,1095	87
Kopfdeformität	-0,0264	0,8084	87
Mittelstückdeformität	0,1351	0,2122	87
Schwanzdeformität	0,211	0,0501	87

## 5.2 Leukozytenkonzentration

Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Leukozytenkonzentration und dem pH-Wert des Ejakulates. Mit zunehmender Leukozytenzahl stieg auch der pH-Wert an ( $r=0,297$ ;  $P=0,0059$ ;  $n=87$ ) (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Korrelation zwischen der Leukozytendichte und dem pH-Wert des Ejakulates.

Zwischen der Leukozytenkonzentration und Spermiedichte, -motilität und -vitalität bestanden ebensowenig signifikanten Korrelationen wie zwischen Leukozytendichte und DNA-Fragmentation. Es zeigte sich lediglich die Tendenz, dass mit zunehmender Leukozytenzahl die mittels TUNEL-Assay nachgewiesene DNA-Fragmentation anstieg ( $r=0,164$ ;  $P=0,1271$ ;  $n=87$ ).

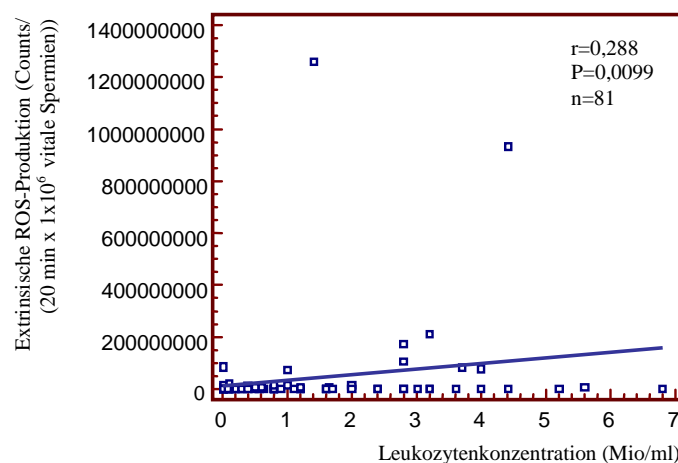
## 5.3 ROS-Produktion

In Kapitel 5.3 wurde der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf verschiedene Spermatozoenparameter untersucht, wobei zwischen der extrinsischen, von den Leukozyten ausgehenden, und der intrinsischen ROS-Produktion durch die Spermatozoen selbst unterschieden wurde.

### 5.3.1 Einfluss der extrinsischen ROS-Produktion auf verschiedene Spermatozoen-Parameter

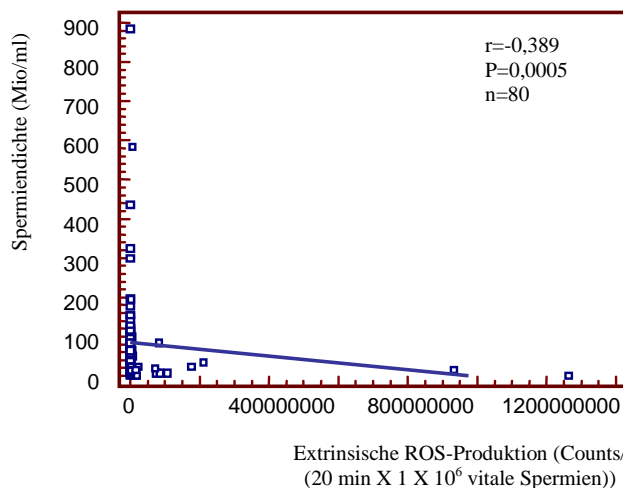
Betrachtet wurde der Zusammenhang zwischen der leukozytären ROS-Produktion, der Leukozytenkonzentration, dem pH-Wert des Ejakulates, der Spermiedichte, -motilität und -vitalität sowie der intrinsischen ROS-Produktion. Die Korrelationen zwischen den genannten Parametern sind im Folgenden aufgeführt.

Es stellte sich ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der Leukozytenkonzentration im Ejakulat und der extrinsischen ROS-Produktion heraus, der in Abbildung 14 wiedergegeben ist.



**Abbildung 14:** Zusammenhang zwischen Leukozytendichte und extrinsischer ROS-Produktion im Ejakulat.

Zwischen extrinsischer ROS-Produktion und dem pH-Wert des Ejakulates konnte kein Zusammenhang festgestellt werden ( $r=0,061$ ;  $P=0,5856$ ;  $n=80$ ). Ähnlich verhielt sich der Einfluss der ROS-Produktion auf die Spermienmotilität. Auch hier bestanden keine signifikanten Korrelationen. Jedoch fand sich eine hochsignifikant negative Korrelation zwischen der extrinsischen ROS-Produktion und der Spermiedichte. Je mehr Sauerstoffradikale von den Leukozyten produziert wurden, umso geringer war die Spermatozoendichte (Abbildung 15). Ein signifikant negativer Zusammenhang bestand auch zwischen extrinsischer ROS-Produktion und der Spermatozoenvitalität ( $r=-0,254$ ,  $P=0,0231$ ,  $n=81$ ).



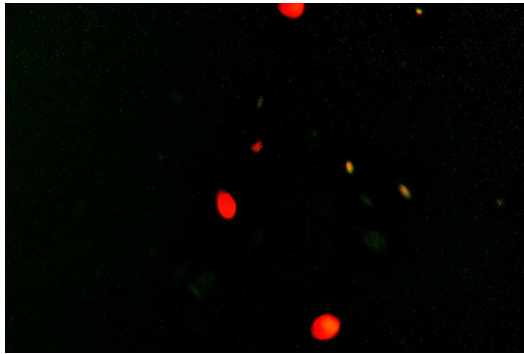
**Abbildung 15:** Zusammenhang zwischen extrinsischer ROS-Produktion und Spermatozoendichte.

Die extrinsische ROS-Produktion korrelierte signifikant mit der mittels des TUNEL-Assays bestimmten DNA-Fragmentation der Spermatozoen ( $r=0,224$ ;  $P=0,0469$ ;  $n=80$ ). Mit zunehmender leukozytärer ROS-Produktion stieg die DNA-Fragmentation an. Zwischen extrinsischer und intrinsischer ROS-Produktion wurden keine signifikanten Korrelationen deutlich.

### 5.3.2 Einfluss der intrinsischen ROS-Produktion auf verschiedene Spermatozoen-Parameter

Bei der intrinsischen ROS-Produktion, also den von den Spermatozoen selbst produzierten Sauerstoffradikalen, wurde unterschieden zwischen ROS-produzierenden Spermien mit und ohne Zytoplasmarest im Mittelstück und dem gesamten Anteil ROS-produzierender Spermien am Ejakulat. Diese Unterscheidung wurde getroffen, weil in Spermatozoen mit Zytoplasmarest im Mittelstück eine höhere Konzentration des zytoplasmatischen Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase vorliegt, als in Spermatozoen ohne Zytoplasmarest. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase stimuliert die ROS-Produktion in den Spermatozoen, so dass ein hoher Anteil an Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück als Indikator für eine hohe ROS-Produktion durch die Spermien angesehen werden kann. Bestimmt wurde die intrinsische ROS-Produktion durch die Dihydroethidium-Fluoreszenzfärbung, was in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt ist.





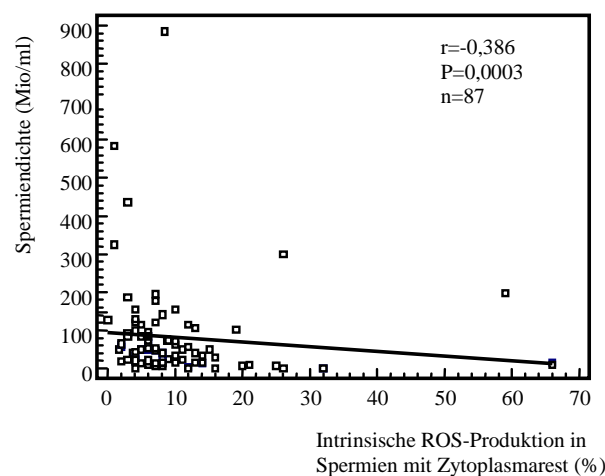
**Abbildung 16:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung Dihydroethidium-gefärbter Spermatozoen. Die leuchtend roten Spermien produzieren ROS.



**Abbildung 17:** Darstellung des gleichen Ejakulatausstriches wie in Abbildung 16 unter lichtmikroskopischen Bedingungen.

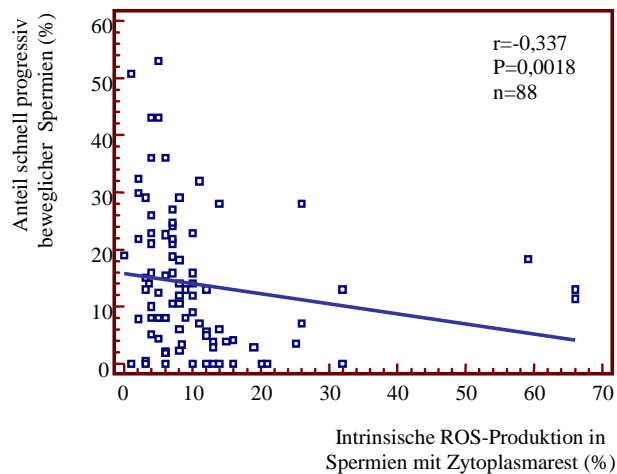
Kein Zusammenhang bestand zwischen intrinsischer ROS-Produktion und Leukozytenkonzentration des Ejakulates.

Zwischen der intrinsischen ROS-Produktion in Spermatozoen mit Zytoplasmarest und der Spermiedichte zeigte sich ein signifikant negativer Zusammenhang ( $r=-0,386$ ;  $P=0,0003$ ;  $n=87$ ). Weniger deutlich, aber immer noch signifikant, war die Korrelation zwischen der gesamten intrinsischen ROS-Produktion und der Spermienkonzentration ( $r=-0,272$ ;  $P=0,0112$ ;  $n=88$ ), während die ROS-Produktion in Spermien ohne Zytoplasmarest nicht signifikant mit der Spermiedichte korrelierte ( $r=-0,127$ ;  $P=0,2413$ ;  $n=86$ ). Die Korrelation zwischen der intrinsischen ROS-Produktion in Spermien mit Zytoplasmarest und der Spermiedichte ist in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18:** Zusammenhang zwischen intrinsischer ROS-Produktion in Spermatozoen mit Zytoplasmarest im Mittelstück und Spermiedichte.

Mit zunehmender intrinsischer ROS-Produktion nahm die Motilität der Spermatozoen ab. Deutlich wurde das vor allem bei den ROS-produzierenden Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück. Es bestand eine deutliche, signifikant negative Korrelationen zwischen den schnell vorwärts beweglichen Spermien und der intrinsischen ROS-Produktion ( $r=0,337$ ;  $P=0,0018$ ;  $n=88$ ; Abbildung 19). Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 bis 17 zusammengefasst.



**Abbildung 19:** Zusammenhang zwischen intrinsischer ROS-Produktion in Spermatozoen mit Zytoplasmarest im Mittelstück und dem Anteil schnell progressiv beweglicher Spermien (WHO A) am Ejakulat.

**Tabelle 15:** Zusammenhänge zwischen gesamter intrinsischer ROS-Produktion in Spermatozoen und der Spermatozoenmotilität.

	<b>r</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
WHO A	-0,205	0,0548	88
WHO B	-0,1298	0,2281	88
Progressivmotilität (WHO A + B)	-0,2258	<b>0,0344</b>	88
Gesamtmotilität	-0,2398	<b>0,0244</b>	88

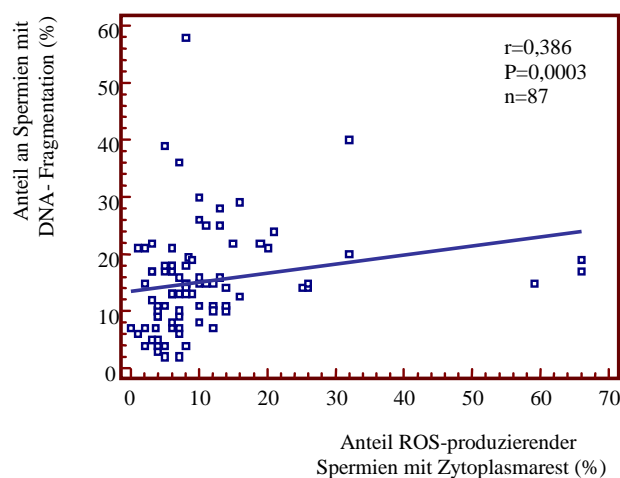
**Tabelle 16:** Zusammenhänge zwischen intrinsischer ROS-Produktion in Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück und der Spermatozoenmotilität.

	<b>r</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
WHO A	-0,337	<b>0,0018</b>	88
WHO B	-0,04	0,7113	88
Progressivmotilität (WHO A + B)	-0,274	<b>0,0112</b>	88
Gesamtmotilität	-0,292	<b>0,0067</b>	88

**Tabelle 17:** Zusammenhänge zwischen intrinsischer ROS-Produktion in Spermien ohne Zytoplasmarest im Mittelstück und der Spermatozoenmotilität.

	<b>r</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
WHO A	-0,1518	0,1630	88
WHO B	-0,1254	0,25	88
Progressivmotilität (WHO A + B)	-0,1882	0,0828	88
Gesamtmotilität	-0,1905	0,0784	88

Hinsichtlich DNA-Fragmentation und intrinsischer ROS-Produktion zeigte sich lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil ROS-produzierender Spermatozoen mit Zytoplasmarest im Mittelstück und der DNA-Fragmentation. Hier stieg mit zunehmender ROS-Produktion der Anteil an Spermien mit geschädigter DNA an. Die gesamte intrinsische ROS-Produktion ( $r=0,0041$ ;  $P=0,9696$ ;  $n=87$ ) und die intrinsische ROS-Produktion in Spermatozoen ohne Zytoplasmarest im Mittelstück ( $r=-0,0926$ ;  $P=0,3965$ ;  $n=86$ ) korrelierten nicht signifikant mit der DNA-Fragmentation. Der Einfluss der intrinsischen ROS-Produktion in Spermien mit Zytoplasmarest auf die DNA-Fragmentation ist in Abbildung 20 dargestellt.

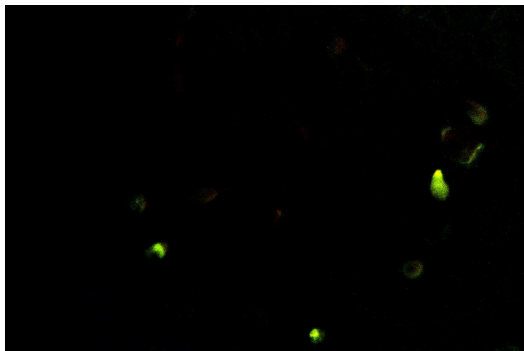


**Abbildung 20:** Zusammenhang zwischen der ROS-Produktion in Spermatozoen mit Zytoplasmarest im Mittelstück und dem Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentation.

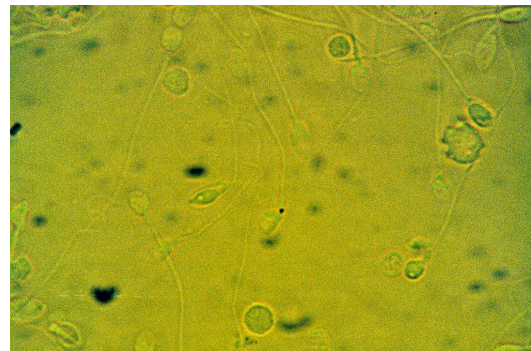
## 5.4 DNA-Fragmentation

Der Anteil der Spermatozoen mit fragmentierter DNA am Ejakulat wurde mit Hilfe des TUNEL-Assays ermittelt. In diesem Kapitel wird der Zusammenhang zwischen der DNA-Fragmentation und verschiedenen anderen Spermatozoenparametern untersucht. In den Abbildungen 21 und 22 sind fluoreszierende Spermien nach Anfärbung mittels des TUNEL-

Assays und das entsprechende lichtmikroskopische Bild dargestellt. Spermien, die unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchten, weisen eine DNA-Fragmentation auf.

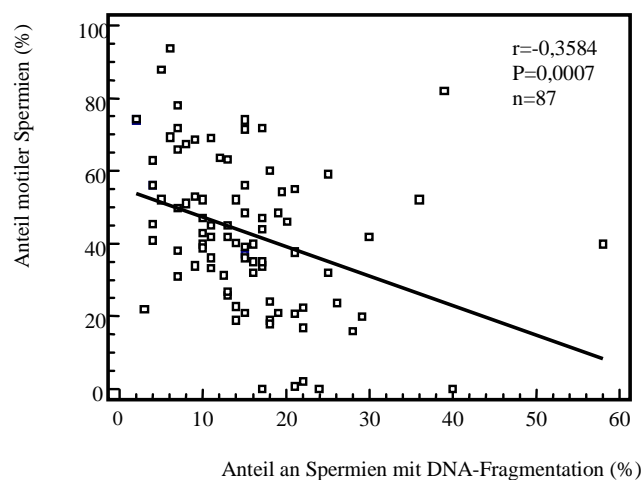


**Abbildung 21:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der DNA-Fragmentation von Spermatozoen mittels TUNEL-Assay. Die grün fluoreszierenden Spermatozoen weisen eine DNA-Fragmentation auf.



**Abbildung 22:** Lichtmikroskopische Darstellung des gleichen Ejakulatausstriches wie in Abbildung 21.

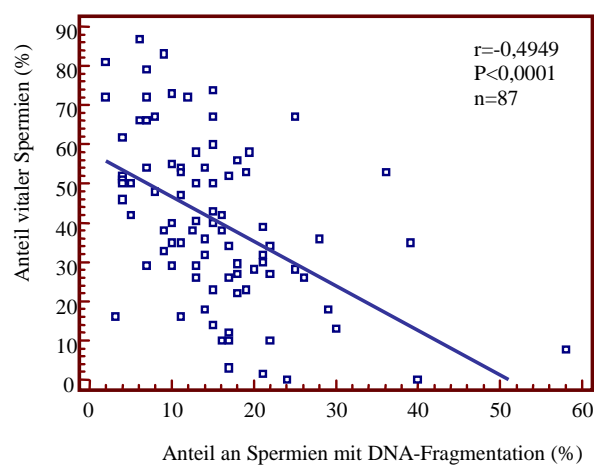
Zwischen DNA-Fragmentation der Spermien und Spermiedichte ( $r=-0,161$ ;  $P=0,136$ ;  $n=87$ ) konnte ebensowenig eine signifikante Korrelation festgestellt werden, wie zwischen DNA-Fragmentation und dem pH-Wert des Ejakulates ( $r=-0,114$ ;  $P=0,2923$ ;  $n=86$ ). Signifikante Zusammenhänge bestanden allerdings zwischen DNA-Fragmentation und Spermatozoenmotilität. Die Motilität nahm mit ansteigender DNA-Fragmentation ab. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 18 und Abbildung 23 dargestellt. Weiterhin zeigte sich eine signifikant negative Korrelation zwischen DNA-Fragmentation und Spermienvitalität, die die Abbildung 24 verdeutlicht.



**Abbildung 23:** Zusammenhang zwischen dem Anteil an Spermatozoen mit DNA-Fragmentation und dem Anteil motiler Spermatozoen am Ejakulat.

**Tabelle 18:** Zusammenhänge zwischen dem Anteil an Spermatozoen mit DNA-Fragmentation und der Spermienmotilität, -dichte und dem pH-Wert des Ejakulates.

		<b>r</b>	<b>P</b>	<b>n</b>
Motilität	WHO A	-0,1905	0,0771	87
	WHO B	-0,2912	<b>0,0062</b>	87
	Progressivmotilität	-0,3323	<b>0,0017</b>	87
	Gesamtmotilität	-0,3584	<b>0,0007</b>	87
Spermiendichte		-0,161	0,136	87
pH		-0,114	0,2923	86



**Abbildung 24:** Zusammenhang zwischen dem Anteil an Spermatozoen mit DNA-Fragmentation und dem Anteil vitaler Spermatozoen am Ejakulat.

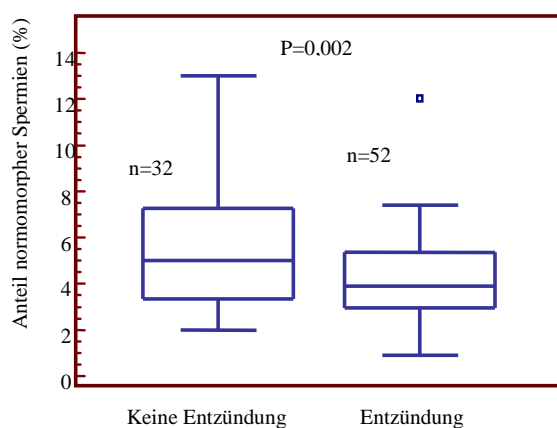
### 5.5 Vergleiche zwischen verschiedenen Entzündungen des männlichen Genitaltraktes

In Kapitel 5.5 wurden verschiedene Entzündungen des männlichen Genitalsystems miteinander verglichen. Es wurde unterschieden zwischen Patienten mit (alle im Folgenden spezifizierten Entzündungen) und ohne Entzündung; zwischen Patienten mit einer Entzündung, die frühe Stadien der Spermienreifung (Orchitis, Epididymitis) bzw. späte Stadien der Spermienreifung (Prostatitis, Vesikulitis, Urethritis) beeinflussen können, sowie zwischen den einzelnen Infektionen: Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis und MAGI. Unter der Patientengruppe mit MAGI wurden die Parameter der Ejakulate zusammengefasst, die eine Leukozytospemie aufwiesen, denen aber keine der anderen genannten Entzündungen eindeutig zugeordnet werden konnte.

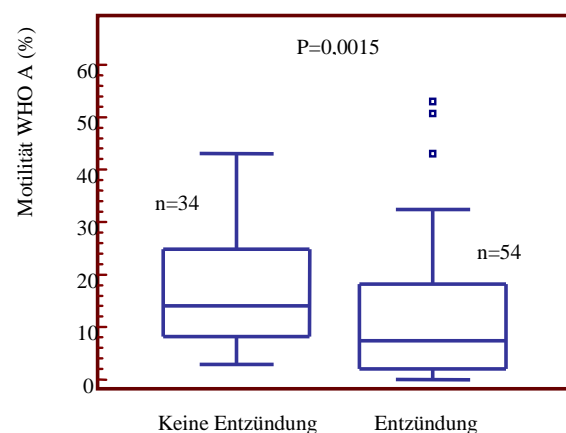
### 5.5.1 Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit Entzündung im Genitaltrakt und Ejakulaten von Patienten ohne entsprechende Entzündung

Die Unterscheidung zwischen Ejakulaten von Patienten mit Entzündung des Genitalsystems von solchen ohne Infektion wurde anhand des klinischen Erscheinungsbildes und der Leukozytenzahl im Ejakulat getroffen: Ab einer Leukozytenkonzentration von  $>1 \times 10^6$  Leukozyten/ml Ejakulat liegt laut WHO (1999) eine Leukozytospemie und damit eine Entzündung vor. Untersucht wurden die Ejakulate von 34 Patienten ohne und 54 Patienten mit Infektion.

Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen konnten hinsichtlich Spermatozoenmorphologie und –motilität festgestellt werden. Der Anteil normomorpher Spermien im Ejakulat war in Ejakulaten mit inflammatorischen Prozessen signifikant niedriger (Papanicolaou:  $4,23 \% \pm 2,44 \%$ ; Shorr:  $4,07 \% \pm 2,13 \%$ ; Testsimplets:  $3,46 \% \pm 2,48 \%$ ), als bei Patienten ohne Entzündung (Papanicolaou:  $5,62 \% \pm 2,51 \%$ ; Shorr:  $5,86 \% \pm 3,02 \%$ ; Testsimplets:  $4,58 \% \pm 2,49 \%$ ) des Genitalsystems (Papanicolaou:  $P=0,0121$ ; Shorr:  $P=0,002$ ; Testsimplets:  $P=0,0416$ ). Dieser Unterschied ist für die Färbung nach Papanicolaou in Tabelle 19 dargestellt; Abbildung 25 zeigt den entsprechenden Vergleich für die Shorr-Färbung. Hinsichtlich der Motilität konnte festgestellt werden, dass der Anteil schnell progressiv beweglicher Spermatozoen (WHO A) in Ejakulaten ohne Entzündung signifikant höher lag ( $17,44 \% \pm 10,14 \%$ ), als in Ejakulaten von Patienten mit einer Genitaltraktentzündung ( $11,48 \% \pm 12,99 \%$ ) ( $P=0,0015$ ) (Abbildung 26).



**Abbildung 25:** Vergleich zwischen den Anteilen normomorpher Spermien nach Shorr-Färbung in Ejakulaten mit bzw. ohne Entzündung.



**Abbildung 26:** Vergleich zwischen den Anteilen schnell progressiv beweglicher Spermatozoen in Ejakulaten von Patienten mit bzw. ohne Genitaltraktentzündung.

**Tabelle 19:** Mittelwerte (MW)  $\pm$  SD und Mediane (in %) der verschiedenen morphologischen Parameter nach Papanicolaou-Färbung bei Patienten mit (n=53) bzw. ohne (n=34) Genitaltraktentzündung und Vergleich zwischen beiden Gruppen mittels t- bzw. Mann-Whitney-Test.

	Entzündung		Keine Entzündung		P
	MW $\pm$ SD	Median	MW $\pm$ SD	Median	
Normomorph	4,23 $\pm$ 2,44	4	5,62 $\pm$ 2,51	5,48	<b>0,0121</b>
Kopfdeformität	86,64 $\pm$ 10,59	89	84,07 $\pm$ 10,07	85,2	0,2614
Mittelstückdeformität	39,53 $\pm$ 13,92	37	36,13 $\pm$ 9,31	34,5	0,2123
Schwanzdeformität	22,45 $\pm$ 17,07	21,75	23,01 $\pm$ 10,91	21,75	0,2402

Keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Genitaltraktinfektion bestanden hinsichtlich des pH-Wertes des Ejakulates ( $P=0,4184$ ; Entzündung:  $7,59 \pm 0,33$ , keine Entzündung:  $7,59 \pm 0,29$ ), der leukozytären ROS-Produktion ( $P=0,1194$ ; Entzündung:  $62971311 \text{ Counts/ } 1 \times 10^6 \text{ vitale Spermien} \pm 225015899 \text{ Counts/ } 1 \times 10^6 \text{ vitale Spermien}$ , keine Entzündung:  $4395627 \text{ Counts/ } 1 \times 10^6 \text{ vitale Spermien} \pm 13035934 \text{ Counts/ } 1 \times 10^6 \text{ vitale Spermien}$ ), der Spermiedichte ( $P=0,173$ ; Entzündung:  $105,35 \text{ Mio/ml} \pm 156,32 \text{ Mio/ml}$ , keine Entzündung:  $49,13 \text{ Mio/ml} \pm 42,27 \text{ Mio/ml}$ ) und der Spermiovitalität ( $P=0,8593$ ; Entzündung:  $40,98 \% \pm 22,32 \%$ , keine Entzündung:  $40,16 \% \pm 18,88 \%$ ). Bei der DNA-Fragmentation ließ sich lediglich eine Tendenz erkennen ( $P=0,056$ ). In Ejakulaten mit Entzündung war die DNA-Fragmentation höher ( $16,6 \% \pm 9,96 \%$ ), als in Ejakulaten von Patienten ohne Genitaltraktentzündung ( $12,76 \% \pm 7,24 \%$ ). Signifikant war dieser Unterschied allerdings nicht. Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zeigten sich bei der intrinsischen ROS-Produktion zwischen Ejakulaten von Patienten mit und ohne inflammatorische Prozesse.

### 5.5.2 Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit früher bzw. später Infektion des Genitaltraktes

Untersucht wurden die Ejakulate von 54 Patienten mit einer Infektion des Genitalsystems, von denen 17 eine frühe Genitaltraktentzündung (Orchitis oder Epididymitis), 24 eine späte Genitaltraktentzündung (Prostatitis oder Vesikulitis) und 13 eine Entzündung unbekannten Ursprungs (MAGI) hatten.

Bei keinem der untersuchten Parameter konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der Patienten mit früher und später Entzündung des Genitalsystems festgestellt werden: Für die Leukozytenkonzentration ( $P=0,3894$ ; frühe Entzündung:  $2 \text{ Mio/ml} \pm 1,72 \text{ Mio/ml}$ , späte Entzündung:  $2,83 \text{ Mio/ml} \pm 3,64 \text{ Mio/ml}$ ) ergab sich ebenso wenig eine

signifikante Differenz, wie für den pH-Wert des Ejakulates ( $P=0,2636$ ; frühe Entzündung:  $7,65 \pm 0,23$ , späte Entzündung:  $7,53 \pm 0,38$ ), die extrinsische ROS-Produktion ( $P=0,4868$ ; frühe Entzündung:  $3114033 \text{ counts}/1 \times 10^6 \text{ vitale Spermien} \pm 5904803 \text{ counts}/1 \times 10^6 \text{ vitale Spermien}$ , späte Entzündung:  $11463336 \text{ counts}/1 \times 10^6 \text{ vitale Spermien} \pm 30516779 \text{ counts}/1 \times 10^6 \text{ vitale Spermien}$ ), die Spermiedichte ( $P=0,4831$ ; frühe Entzündung:  $122,45 \text{ Mio/ml} \pm 223,15 \text{ Mio/ml}$ , späte Entzündung:  $85,81 \text{ Mio/ml} \pm 81,95 \text{ Mio/ml}$ ), die DNA-Fragmentation ( $P=0,1354$ ; frühe Entzündung:  $12,76 \% \pm 7,24 \%$ , späte Entzündung:  $13,28 \% \pm 5,54 \%$ ) und die Vitalität ( $P=0,5992$ ; frühe Entzündung:  $42,76 \% \pm 24,6 \%$ , späte Entzündung:  $40,6 \% \pm 21,57 \%$ ). Auch bezüglich der Spermatozoenmorphologie (Anteil normomorpher Spermien nach Papanicolaou-Färbung:  $P=0,4944$ ; frühe Genitaltraktentzündung:  $4,71 \% \pm 2,42 \%$ , späte Genitaltraktentzündung:  $4,21 \% \pm 2,15 \%$ ; Tabelle 20) und –motilität (WHO A:  $P=0,4773$ ; frühe Genitaltraktentzündung:  $8,42 \% \pm 9,95 \%$ , späte Genitaltraktentzündung:  $11,33 \% \pm 14,43 \%$ ) sowie intrinsischer ROS-Produktion (gesamte intrinsische ROS-Produktion:  $P=0,216$ ; frühe Genitaltraktentzündung:  $66,79 \% \pm 20,11 \%$ , späte Genitaltraktentzündung:  $58,07 \% \pm 23,04 \%$ ) unterschieden sich die beiden Gruppen nicht voneinander.

**Tabelle 20:** Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane (in %) der morphologischen Parameter nach Papanicolaou-Färbung von Ejakulaten von Patienten mit früher ( $n=17$ ) und später ( $n=23$ ) Genitaltraktentzündung sowie Vergleich beider Gruppen mittels t-bzw. Mann-Whitney-Test.

Morphologie-Parameter	Frühe Genitaltraktentzündung		Späte Genitaltraktentzündung		P
	MW $\pm$ SD	Median	MW $\pm$ SD	Median	
Normomorph	$4,71 \pm 2,42$	4,5	$4,21 \pm 2,15$	4	0,4944
Kopfdeformität	$84,75 \pm 11,96$	86	$87,67 \pm 8,41$	89	0,3694
Mittelstückdeformität	$38,18 \pm 15,76$	34	$37,73 \pm 12,84$	37	0,9211
Schwanzdeformität	$23,72 \pm 22,27$	14,6	$16,94 \pm 12,44$	15,6	0,2667

### 5.5.3 Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit verschiedenen Infektionen des Genitalsystems

Es wurden die Ejakulate von Patienten mit Orchitis ( $n=8$ ), Epididymitis ( $n=9$ ), Prostatitis ( $n=12$ ), Vesikulitis ( $n=8$ ) und MAGI ( $n=13$ ) miteinander und mit Ejakulaten von Patienten ohne Genitaltraktinfektion ( $n=34$ ) verglichen.



**Tabelle 21:** Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane des Anteils normomorpher Spermien nach Papanicolaou-Färbung (in %) in Ejakulaten von Patienten ohne Entzündung des Genitaltraktes, mit Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis sowie MAGI.

	<b>Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	<b>Median</b>
Keine Entzündung	5,62 $\pm$ 2,51	5,48
Orchitis	5,21 $\pm$ 2,99	4,5
Epididymitis	4,27 $\pm$ 1,84	4,5
Prostatitis	3,6 $\pm$ 1,56	4
Vesikulitis	4,75 $\pm$ 2,29	4,15
MAGI	3,65 $\pm$ 2,96	2

**Tabelle 22:** Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane der Spermatozoendichte im Ejakulat (in Mio/ml) bei Patienten ohne Entzündung des Genitaltraktes, mit Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis sowie MAGI.

	<b>Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	<b>Median</b>
Keine Entzündung	49,13 $\pm$ 41,27	40
Orchitis	158,96 $\pm$ 300,44	33,2
Epididymitis	90 $\pm$ 134,51	57,2
Prostatitis	104,65 $\pm$ 74,87	89,05
Vesikulitis	35,98 $\pm$ 20,29	34,15
MAGI	119,03 $\pm$ 165,15	50,25

**Tabelle 23:** Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane des Anteils schnell progressiv beweglicher Spermatozoen (in %) in Ejakulaten von Patienten ohne Entzündung des Genitaltraktes, mit Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis sowie MAGI.

	<b>Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	<b>Median</b>
Keine Entzündung	17,44 $\pm$ 10,14	14
Orchitis	7,56 $\pm$ 7,61	6,995
Epididymitis	9,18 $\pm$ 12,07	3
Prostatitis	10,08 $\pm$ 14,3	6,55
Vesikulitis	10,36 $\pm$ 11,09	9,1
MAGI	15,78 $\pm$ 13,42	12

**Tabelle 24:** Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane des Anteils an Spermatozoen mit DNA-Fragmentation (in %) in Ejakulaten von Patienten ohne Entzündung des Genitaltraktes, mit Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis sowie MAGI.

	<b>Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	<b>Median</b>
Keine Entzündung	12,76 $\pm$ 7,24	13
Orchitis	15,69 $\pm$ 8,03	15,5
Epididymitis	17,89 $\pm$ 10,53	17
Prostatitis	15,45 $\pm$ 3,53	15
Vesikulitis	11,94 $\pm$ 7,63	8,5
MAGI	22,15 $\pm$ 14,35	18

**Tabelle 25:** Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane des Anteils vitaler Spermien (in %) in Ejakulaten von Patienten ohne Entzündung des Genitaltraktes, mit Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis sowie MAGI.

	<b>Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	<b>Median</b>
Keine Entzündung	40,16 $\pm$ 18,89	38,5
Orchitis	46,13 $\pm$ 17,24	45
Epididymitis	39,78 $\pm$ 30,47	52
Prostatitis	39,79 $\pm$ 21,62	34,5
Vesikulitis	52,5 $\pm$ 20,18	55
MAGI	28,27 $\pm$ 16,08	28

**Tabelle 26:** Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane des Anteils ROS-produzierender Spermien (in %) in Ejakulaten von Patienten ohne Entzündung des Genitaltraktes, mit Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis sowie MAGI.

	<b>Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	<b>Median</b>
Keine Entzündung	59,88 $\pm$ 23,91	65
Orchitis	60,81 $\pm$ 15,83	62,5
Epididymitis	72,11 $\pm$ 22,84	77
Prostatitis	58,67 $\pm$ 23,76	62
Vesikulitis	53,46 $\pm$ 22,6	60
MAGI	46,23 $\pm$ 24,62	44

Für die Patientengruppe mit einer Orchitis (n=8) zeigten sich signifikante Unterschiede mit der Kontrollgruppe bezüglich Spermindichte (P=0,0393; Kontrollgruppe: 49,13 Mio/ml  $\pm$  41,27 Mio/ml; Orchitis: 158,96 Mio/ml  $\pm$  300,44 Mio/ml) und Motilität (WHO A: P=0,0137, WHO B: P=0,0005; Kontrollgruppe WHO A: 17,44 %  $\pm$  10,14 %, Orchitis WHO A: 7,56 %  $\pm$

7,61 %). Die Spermatozoendichte bei Patienten mit einer Orchitis war signifikant höher, als bei Patienten ohne Infektion. Der Anteil progressiv beweglicher Spermatozoen war in Ejakulaten ohne Entzündung signifikant höher als bei Orchitis-Patienten. Im Vergleich der Orchitis-Gruppe mit den Ejakulaten von Patienten mit Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis und MAGI konnten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden. Signifikante Differenzen bestanden weder hinsichtlich Leukozytendichte, morphologischen Parametern, pH-Wert des Ejakulates, extrinsischer und intrinsischer ROS-Produktion, Spermindichte, DNA-Fragmentation, Vitalität noch Motilität.

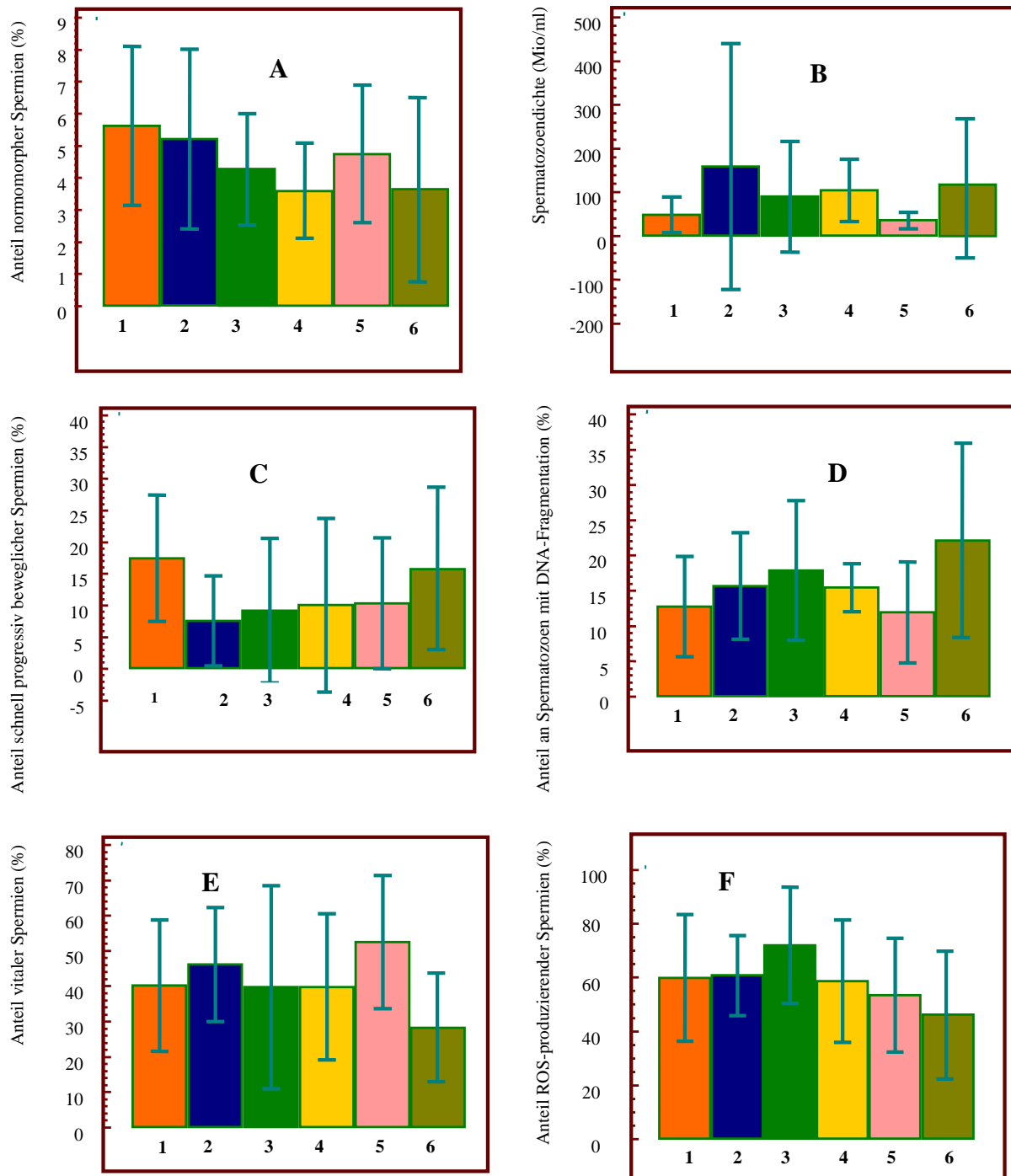
Bei den Patienten mit einer Epididymitis (n=9) bestand ein signifikanter Unterschied bezüglich der Motilität im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Infektion. Der Anteil schnell progressiv beweglicher Spermien war bei der Kontrollgruppe deutlich höher, als bei den Epididymitis-Patienten ( $P=0,0428$ ; Kontrollgruppe:  $17,44 \% \pm 10,14 \%$ , Epididymitis:  $9,18 \% \pm 12,07 \%$ ), während der Anteil immotiler Spermien bei den Epididymitis-Patienten signifikant höher war ( $P=0,0404$ ; Kontrollgruppe:  $54,74 \% \pm 17,77 \%$ , Epididymitis:  $70 \% \pm 24,37 \%$ ). Die übrigen Spermatozoenparameter der Epididymitis-Patienten unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe. Ebenso fanden sich keine deutlichen Differenzen zwischen den Ejakulatparametern der Epididymitis-Patienten und der Orchitis-Gruppe, den Patienten mit Prostatitis, Vesikulitis sowie MAGI bezüglich Leukozytenkonzentration, morphologischen Parametern, pH-Wert, extrinsischer und intrinsischer ROS-Produktion, Spermindichte, DNA-Fragmentation, Vitalität und Motilität.

In der Patienten-Gruppe mit einer Prostatitis (n=12) waren keine signifikanten Unterschiede mit der Kontrollgruppe in Hinblick auf alle untersuchten Parameter vorhanden. Auch im Vergleich mit Orchitis, Epididymitis, Vesikulitis und MAGI ließen sich bezüglich Leukozytenkonzentration, morphologischen Parametern, pH-Wert, extrinsischer und intrinsischer ROS-Produktion, Spermindichte, DNA-Fragmentation, Vitalität und Motilität keine deutlichen Differenzen erkennen.

Für die Ejakulate von Patienten mit Vesikulitis (n=8) ließen sich im Wesentlichen die gleichen Sachverhalte feststellen, wie für die Ejakulate der Prostatitis-Patienten: Es bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich aller untersuchter Parameter zwischen der Vesikulitis-Gruppe und der Kontrollgruppe. Auch im Vergleich zwischen Vesikulitis und Orchitis, Epididymitis, Prostatitis sowie MAGI zeichneten sich keine deutlichen Unterschiede

bezüglich Leukozytenkonzentration, morphologischen Parametern, pH-Wert, extrinsischer und intrinsischer ROS-Produktion, Spermiedichte, DNA-Fragmentation, Vitalität und Motilität ab.

Die Ejakulate der Patienten mit einer Infektion unbekannten Ursprungs (MAGI) unterschieden sich in einigen Parametern signifikant von den Ejakulaten aus der Kontrollgruppe. Bei den MAGI-Patienten (n=13) war der Anteil normomorpher Spermatozoen nach Färbung nach Shorr und Papanicolaou signifikant niedriger, als bei der Kontrollgruppe (Papanicolaou:  $P=0,0263$ , Shorr:  $P=0,0332$ ; Kontrollgruppe Papanicolaou:  $5,62 \% \pm 2,51 \%$ , MAGI Papanicolaou:  $3,65 \% \pm 2,96 \%$ ), während der Anteil an Spermien mit Mittelstückdeformitäten bei den Ejakulaten der MAGI-Gruppe signifikant höher lag, als bei den Gesunden (Papanicolaou:  $P=0,0181$ ; Shorr:  $P=0,0308$ ; Testsimplet:  $P=0,0228$ ; Kontrollgruppe Papanicolaou:  $36,13 \% \pm 9,31 \%$ , MAGI:  $44,49 \% \pm 13,07 \%$ ). Ebenfalls signifikant war die Differenz zwischen der extrinsischen ROS-Produktion bei MAGI-Patienten und Gesunden ( $P=0,0152$ ; Kontrollgruppe:  $4395627 \text{ Counts}/1 \times 10^6 \text{ vitale Spermien} \pm 13035934 \text{ Counts}/1 \times 10^6 \text{ vitale Spermien}$ , MAGI:  $211922692 \text{ Counts}/1 \times 10^6 \text{ vitale Spermien} \pm 404790687 \text{ Counts}/1 \times 10^6 \text{ vitale Spermien}$ ). Hier lag die Produktion an Sauerstoffradikalen in der Gruppe der Patienten mit Entzündung deutlich höher, als in der Vergleichsgruppe. Weiterhin war die Spermatozoendichte in Ejakulaten von MAGI-Patienten signifikant höher, als in der Kontrollgruppe ( $P=0,0248$ ; Kontrollgruppe:  $49,13 \text{ Mio/ml} \pm 41,27 \text{ Mio/ml}$ , MAGI:  $119,03 \text{ Mio/ml} \pm 165,15 \text{ Mio/ml}$ ). Der Anteil an Spermatozoen mit fragmentierter DNA war bei den MAGI-Patienten deutlich höher, als bei den Gesunden ( $P=0,0046$ ; Kontrollgruppe:  $12,76 \% \pm 7,24 \%$ , MAGI:  $22,15 \% \pm 14,35 \%$ ). Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich bei pH-Wert, intrinsischer ROS-Produktion, Vitalität und Motilität zwischen Ejakulaten aus der MAGI-Gruppe und der Kontrollgruppe. Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bestanden zwischen den Ejakulaten von MAGI-Patienten und Orchitis-, Epididymitis-, Prostatitis- und Vesikulitis-Patienten bezüglich Leukozytenkonzentration, morphologischen Parametern, pH-Wert, extrinsischer und intrinsischer ROS-Produktion, Spermiedichte, DNA-Fragmentation, Vitalität und Motilität. In Abbildung 27 A-F sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Spermiedichte, -motilität, -morphologie, -vitalität, DNA-Fragmentation und intrinsischer ROS-Produktion bei Patienten ohne Genitaltraktentzündung, mit Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis sowie MAGI exemplarisch dargestellt. Die zugehörigen Zahlenwerte sind in Tabelle 21 bis 26 aufgeführt.



**Abbildung 27:** Mittelwerte und Standardabweichungen verschiedener Spermatozoenparameter von Patienten ohne Entzündung des Genitaltraktes (n=34; **1**), von Patienten mit Orchitis (n=8; **2**), Epididymitis (n=9; **3**), Prostatitis (n=12; **4**), Vesikulitis (n=8; **5**) sowie MAGI (n=13; **6**). A=Anteil normomorpher Spermien nach Papanicolaou-Färbung (%); B=Spermiendichte (Mio/ml); C=Anteil schnell progressiv beweglicher Spermien (%); D=Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentation (%); E=Anteil vitaler Spermien (%); F=Anteil ROS-produzierender Spermien (%).

## **6. Diskussion**

### **6.1 Zusammenhänge zwischen verschiedenen Spermatozoenparametern**

#### **6.1.1 Zusammenhänge zwischen der Spermatozoenmorphologie und verschiedenen Spermatozoenparametern**

Die Morphologie der Spermatozoen ist ein für eine erfolgreiche Fertilisation, auch im Rahmen von IUI (Intrauterine Insemination) und IVF (In-vitro Fertilisation), entscheidender Parameter (Kruger et al., 1988; Grow et al., 1994; Aziz et al., 1996; Kruger und Coetzee, 1999; Menkveld et al., 2001; Said et al., 2005b). Gerade bei Entzündungen des Genitalsystems lässt sich eine im Durchschnitt schlechtere Morphologie als bei Gesunden evaluieren (Berger et al., 1982; Eggert-Kruse et al., 1992; Gonzales et al., 1992; Yanushpolsky et al., 1996; Thomas et al., 1997; Menkveld und Kruger, 1998; Aziz et al., 2004a). Der Pathomechanismus dafür ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Zum einen wird angenommen, dass eine exzessive leukozytäre ROS-Produktion, wie sie bei inflammatorischen Prozessen vorkommt, frühe Stadien der Spermatogenese negativ durch Oxidationsvorgänge beeinflusst (Plante et al., 1994; Aitken et al., 1995a; Ochsendorf, 1999; Gil-Guzman et al., 2001; Ollero et al., 2001; Alvarez et al., 2002), was auch im Rahmen dieser Untersuchung durch einen signifikant positiven Zusammenhang zwischen leukozytärer ROS-Produktion und dem Anteil an Spermien mit Mittelstückdeformitäten (Papanicolaou:  $r=0,29$ ;  $P=0,0096$ ;  $n=81$ ) bestätigt werden konnte. Zum anderen belegen Studien, dass Zytokine, die bei Entzündungen von den Leukozyten produziert werden, die Sertoli-Zell-Funktion beeinträchtigen und auf diese Weise zu einer gestörten Spermatogenese mit resultierenden morphologischen Defekten führen (Cohen und Pollard, 1995). So zeigte sich, dass in Ejakulaten mit Leukozytospemie der Anteil an Spermatozoen mit Akrosomdefekten, Schwanzdefekten und Zytoplasmaresten im Mittelstück gegenüber Gesunden deutlich erhöht ist (Alvarez et al., 2002; Saleh et al., 2002a; Aziz et al., 2004a).

In der vorliegenden Arbeit konnte der schädigende Einfluss aktivierter Leukozyten auf die Spermienmorphologie, der bereits von Berger et al. (1982), Eggert-Kruse et al. (1992), Gonzales et al. (1992), Yanushpolsky et al. (1996), Thomas et al. (1997), Menkveld und Kruger (1998) sowie Aziz et al. (2004a) beschrieben wurde, ebenfalls eindrucksvoll belegt werden. Es stellte sich heraus, dass mit zunehmender Leukozytenkonzentration im Ejakulat der Anteil normomorpher Spermien sank (Papanicolaou:  $r=-0,379$ ;  $P=0,0004$ ;  $n=87$ ), während

der Anteil an Kopfdeformitäten nach Papanicolaou-Färbung zunahm ( $r=0,215$ ;  $P=0,0457$ ;  $n=87$ ).

Mögliche Folge der durch die Leukozyten beeinträchtigten Spermienmorphologie ist eine gesteigerte ROS-Produktion durch die Spermien selbst (Aitken et al., 1995b, 1996 und 1998; Twigg et al., 1998b; Barroso et al., 2000; Said et al., 2005a). Eine besondere Rolle scheint dabei den Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück zuzukommen. (Aziz et al., 2004a; Said et al., 2005a, b). Durch die zytoplasmatischen Residuen enthalten diese Spermatozoen einen höheren Anteil an Zytoplasma, als normomorphe Spermien. Entsprechend höher ist auch der Anteil zytoplasmatischer Enzyme, unter denen pathogenetisch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase am bedeutendsten zu sein scheint (Aitken et al., 1994a; Huszar und Vigue, 1994; Gomez et al., 1996; Twigg et al., 1998a). Dieses Enzym ist an der Verstoffwechselung von Glukose über den Hexosemonophosphatweg beteiligt und reguliert in diesem Zusammenhang die intrazelluläre NADPH-Konzentration (Aitken et al., 1994a; Huszar und Vigue, 1994; Gomez et al., 1996; Aitken et al., 1997 und 1998; Fisher und Aitken, 1997). NADPH kann in den Spermien als Elektronendonator fungieren und ist so maßgeblich an der intrazellulären ROS-Produktion der Spermien beteiligt (Aitken et al., 1995b, 1996 und 1998; Twigg et al., 1998b; Barroso et al., 2000; Said et al., 2005a). Demzufolge ergibt sich aus einem hohen Anteil an Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück ein hoher Anteil ROS-produzierender Spermien (Aitken et al., 1994a und 1997; Gomez et al., 1996; Ollero et al., 2001; Esfandiari et al., 2003; Aziz et al., 2004b).

In der vorliegenden Arbeit konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Es wurde unterschieden zwischen dem Gesamtanteil ROS-produzierender Spermien, dem Anteil an Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück und solchen ohne Zytoplasmarest. Dabei zeigte sich, dass der Gesamtanteil ROS-produzierender Spermien umso höher war, je geringer der Anteil normomorpher Spermien war (Papanicolaou:  $r=-0,276$ ;  $P=0,0097$ ;  $n=87$ ). Umgekehrt verhielt es sich mit den Kopfdeformitäten. Die ROS-Produktion war umso höher, je größer der Anteil an Spermien mit Kopfdeformitäten war (Papanicolaou:  $r=0,3077$ ;  $P=0,0037$ ;  $n=87$ ). Bei den Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück korrelierte der Anteil an Mittelstückdeformitäten signifikant positiv mit dem Anteil ROS-produzierender Spermien, allerdings nur nach der etablierten und international anerkannten Papanicolaou-Färbung ( $r=0,303$ ;  $P=0,005$ ;  $n=87$ ). In der Gruppe der Spermien ohne Zytoplasmarest im Mittelstück zeigte sich, dass die intrinsische ROS-Produktion mit zunehmendem Anteil an Spermien mit

Kopfdeformitäten anstieg (Papanicolaou:  $r=0,3791$ ;  $P=0,0003$ ), während die Korrelation zwischen intrinsischer ROS-Produktion und dem Anteil normomorpher Spermien signifikant negativ war (Papanicolaou:  $r=-0,3417$ ;  $P=0,0013$ ;  $n=86$ ).

Da intrazelluläre ROS, die physiologischerweise für die Kapazitation und Akrosomreaktion der Spermien erforderlich sind (de Lamirande und Gagnon, 1993a, b; Oehninger et al., 1995; de Lamirande et al., 1997a, b; Thundathil et al., 2003; Rivlin et al., 2003), in den Spermatozoen Oxidationsvorgänge verursachen, kann es bei hohen ROS-Konzentrationen zur DNA-Fragmentation kommen (Teebor et al., 1988; Aitken et al., 1998; Twigg et al., 1998b; Barroso et al., 2000; Kemal Duru et al., 2000; Alvarez et al., 2002; Agarwal und Said, 2003), welche wiederum eine wesentliche Ursache der männlichen Infertilität ist (Sun et al., 1997; Shen et al., 1999; Duran et al., 2002; Tomsu et al., 2002; Zini et al., 2002; Larson-Cook et al., 2003; Sharma et al., 2004). Auf diese Art und Weise bewirken genitale Entzündungen eine morphologische Schädigung der Spermien mit nachfolgender erhöhter intrinsischer ROS-Produktion und DNA-Fragmentation. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass bei einer beeinträchtigten Spermienmorphologie über eine gesteigerte intrinsische ROS-Produktion auch die DNA-Fragmentation der Spermien ansteigt. Zwar war dieser Zusammenhang nicht signifikant, jedoch wurde mit zunehmender DNA-Fragmentation tendentiell ein sinkender Anteil normomorpher Spermien, insbesondere nach Shorr-Färbung, deutlich ( $r=-0,21$ ;  $P=0,0549$ ;  $n=84$ ).

Neben diesen Zusammenhängen zeigt sich auch, dass in Ejakulaten mit einer schlechten Morphologie die Motilität der Spermatozoen reduziert ist (Munuce et al., 2000). Zurückgeführt wird diese Tatsache darauf, dass bei einer Orchitis oder Epididymitis neben den mikroskopisch sichtbaren morphologischen Schäden auch der Aufbau des Spermienflagellums derart gestört wird, dass eine normale Beweglichkeit nicht mehr möglich ist (Aziz et al., 2004a). Diese Beobachtungen konnten bestätigt werden. Es stellte sich heraus, dass mit einem verminderten Anteil normomorpher Spermien auch die Gesamtmotilität der Spermatozoen abnahm (Papanicolaou:  $r=0,4552$ ;  $P<0,0001$ ;  $n=87$ ).

### **6.1.2 Zusammenhänge zwischen der Leukozytenkonzentration im Ejakulat und verschiedenen Spermatozoenparametern**

Eine hohe Leukozytenkonzentration im Ejakulat kann diverse Spermatozoenparameter nachhaltig beeinflussen (Aitken und Baker, 1995; Sukcharoen et al., 1995; Sharma et al.,



2001; Alvarez et al., 2002). Physiologische leukozytäre immunologische Abwehrreaktionen können auf drei Wegen erfolgen: Eine massive Produktion von Sauerstoffradikalen, Phagozytose und anschließende Zersetzung der aufgenommenen Stoffe durch Proteasen (z.B. Peroxidase, Elastase) sowie eine Aktivierung verschiedener Zytokine. Alle genannten Mechanismen dienen der Abwehr von Krankheitserregern, können im Ejakulat jedoch auch zu einer Beeinträchtigung der Spermienfunktion führen.

Der schädigende Einfluss von ROS auf die Spermienmotilität und die DNA-Integrität wurde von Henkel und Schill (1998) sowie Henkel et al. (2005) beschrieben, der der Proteasen von Weiss (1989). Auch zur Zytokinwirkung auf die Spermatozoen gibt es verschiedene Studien (Hill et al., 1987; Eisermann et al., 1989; Ludwig et al. 1998 und 2003; Hochreiter, 2001). Beispielsweise stellten Hill et al. (1987) fest, dass eine erhöhte Konzentration des Tumornekrosefaktors (TNF)- $\alpha$  und von  $\gamma$ -Interferon die Spermienmotilität verringert. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Eisermann et al. (1989). Hier wurde beschrieben, dass eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration im Ejakulat die Spermienmotilität beeinträchtigt. Ein Erklärungsansatz für diesen Sachverhalt stammt von Buch et al. (1994). Die freigesetzten Zytokine TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 $\alpha$  induzieren ROS-vermittelt eine Lipidperoxidation in den Plasmamembranen der Spermien, so dass deren Funktionalität in Mitleidenschaft gezogen wird. Derartig durch leukozytäre Produkte geschädigte Spermatozoen weisen eine deutlich geringere Fähigkeit zur Fertilisation auf, als Spermien aus Ejakulaten ohne Leukozytospermie. Die Arbeiten von Auroux et al. (1985), Wolff und Anderson (1988), Plante et al. (1994), Sukcharoen et al. (1995) sowie Wolff (1995) bestätigen dies. Als mögliche Ursache für die reduzierte Fertilität wird diskutiert, dass granulozytäre Produkte die Hyperaktivierung der Spermatozoen hemmen, sodass Kapazitation und Akrosomreaktion nicht erfolgen können (Yanagimachi et al., 1988; Chan et al., 1994).

Daneben existieren jedoch auch Forschungsergebnisse, bei denen kein Zusammenhang zwischen Leukozytenkonzentration und Fertilität sowie Qualität des Ejakulates festgestellt werden konnte (Aitken et al., 1994b; Trum et al., 1998). Andere Autoren berichten sogar über positive Einflüsse von Leukozyten auf die Ejakulatqualität (Tomlinson et al., 1992 und 1993; Kiessling et al., 1995; Kaleli et al., 2000). Bei den Ergebnissen von Kaleli et al. (2000) ist jedoch zu berücksichtigen, dass hier als Induktor der Akrosomreaktion Kalzium-Ionophor verwendet wurde. Dieser ist jedoch toxisch und korreliert auch nicht mit dem physiologischen Induktor der Akrosomreaktion, der Zona pellucida (Liu und Baker, 1996), so dass diese

Aussage nur eingeschränkt als tatsächlich gegeben zu beurteilen ist. Demgegenüber stehen Ergebnisse, die bereits eine nachhaltige Schädigung der Spermatozoen bei nach WHO-Definition noch physiologischen Leukozytenkonzentrationen von  $<1 \times 10^6$  Mio/ml belegen (Menkveld und Kruger, 1998; Sharma et al., 2001; Punab et al., 2003; Henkel et al., 2005).

Dabei scheint eine entscheidende Rolle zu spielen, ob die Leukozyten, die sich im Seminalplasma befinden, aktiviert sind oder nicht (Ochsendorf, 1998 und 1999; Simbini et al., 1998; Sanocka et al., 2003). Eine Aktivierung der Entzündungszellen erfolgt über bakterielle Stoffwechselprodukte sowie über Zytokine (Wang et al., 1997). Folge ist eine massive leukozytäre ROS-Produktion, die die Spermien schädigt (Ochsendorf, 1998; Simbini et al., 1998; Sanocka et al., 2003). Andererseits schädigen nicht-aktivierte weiße Blutzellen die Spermatozoen nicht oder kaum (Simbini et al., 1998; Sanocka et al., 2003). Das Ausmaß der Schädigung der Spermien durch die Leukozyten ist außerdem abhängig von der protektiven Kapazität des Seminalplasmas (Ochsendorf, 1998 und 1999; Pasqualotto et al., 2000b; Maegawa et al., 2001; Fraczek et al., 2004). Insbesondere Proteaseinhibitoren (Maegawa et al., 2001) und antioxidative Ressourcen des Seminalplasmas wie beispielsweise Vitamin C, Zink, Superoxiddismutase, Transferrin, Laktoferrin, Albumin sowie Harnsäure (Schopf et al., 1984; Bouvet et al., 1990; Aitken et al., 1995a) schützen die Spermien davor, von leukozytären Produkten attackiert zu werden. Sind protektive Kapazitäten in ausreichendem Maße vorhanden, so ist auch eine Schädigung der Spermien durch nach WHO-Definition „normale“ Leukozytenkonzentrationen unwahrscheinlich (Ochsendorf, 1998). Bei fehlendem Seminalplasma jedoch, beispielsweise im Rahmen der Ejakulataufarbeitung bei der assistierten Reproduktion, wirken bereits die Produkte niedrigerer Konzentrationen weißer Blutzellen schädigend auf die Spermien ein (Ochsendorf, 1998).

Ein anderes Problem bei der Festlegung eines Grenzwertes für eine Leukozytospemie mit schädigendem Einfluss auf das Ejakulat ist die Methode der Detektion der weißen Blutzellen (Villegas et al., 2002). Die am weitesten verbreitete und kostengünstigste Variante ist die Peroxidasefärbung, die jedoch die Leukozyten nur dann anfärbt, wenn sie ihre peroxidasehaltigen Granula nicht bereits exozytotisch abgegeben haben. Dadurch werden unter Umständen erhebliche Leukozytenkonzentrationen nicht erfasst und falsch negative Ergebnisse werden ermittelt (Villegas et al., 2002; Henkel et al., 2003b). Genauer, jedoch auch kosten- und zeitintensiver, erscheinen die immunhistochemischen Nachweismethoden mittels monoklonaler Antikörper (Villegas et al., 2002), die aufgrund des Aufwandes jedoch

nur schwer zu etablieren sind. In Anbetracht dieser Studien bleibt die Frage bestehen, ob der WHO-Grenzwert der Leukozytenkonzentration im Ejakulat von  $1 \times 10^6$  Mio/ml adäquat ist, oder ob er nach unten korrigiert werden sollte. In jedem Falle sollte eine einheitliche und anerkannte Methode eingeführt werden, auf deren Grundlage sich dann auch ein weniger strittiger Grenzwert für eine Leukozytospemie festlegen ließe.

Die im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten bestätigen den schädigenden Einfluss weißer Blutzellen auf die Spermatozoen und unterstützen damit die Überlegung, den WHO-Grenzwert zu senken. Mit ansteigender Leukozytenkonzentration stieg die extrinsische ROS-Produktion deutlich an ( $r=0,288$ ;  $P=0,0099$ ;  $n=81$ ), die Morphologie der Spermatozoen verschlechterte sich dahingehend, dass der Anteil normomorpher Spermien ab- (Papanicolaou:  $r=-0,379$ ;  $P=0,0004$ ;  $n=87$ ) und der Anteil an Spermatozoen mit Kopfdeformitäten zunahm ( $r=0,215$ ;  $P=0,0457$ ;  $n=87$ ). Mit diesem Ergebnis konnten die Daten von Eggert-Kruse et al. (1992) und Gonzales et al. (1992) bestätigt werden. Tendenziell nahm auch die Vitalität der Spermatozoen mit steigender Leukozytenkonzentration ab ( $r=0,169$ ;  $P=0,1155$ ;  $n=88$ ), ein weiterer Beleg für den schädigenden Einfluss der Granulozyten auf die Spermatozoen.

Es deutete sich weiterhin, wie schon bei Henkel et al. (2003a) beschrieben, an, dass ein positiver Zusammenhang zwischen Leukozytenkonzentration und dem Anteil an Spermien mit fragmentierter DNA bestehen könnte ( $r=0,164$ ;  $P=0,1271$ ;  $n=87$ ). Diese Tatsache liegt darin begründet, dass aktivierte Leukozyten vermehrt ROS produzieren (Ochsendorf, 1998; Simbini et al., 1998; Sanocka et al., 2003). Derartige hochreaktive instabile Verbindungen zerfallen innerhalb von Milli- bis Nanosekunden und oxidieren dabei Strukturen in ihrer unmittelbaren Umgebung. Um eine DNA-Oxidation und damit verbunden eine DNA-Fragmentation bewirken zu können, müssen die reaktiven Sauerstoffspezies die Plasmamembran der Spermatozoen überwinden. Insbesondere  $H_2O_2$  mit einer relativ langen Halbwertszeit im Millisekundenbereich ist dazu in der Lage und bewirkt so eine nachhaltige Schädigung der DNA (Tenopoulou et al., 2005).

Zwischen Leukozytenkonzentration und Spermiedichte, -motilität und -vitalität konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden, wenngleich dies in diversen anderen Studien der Fall war (Barrat et al., 1990; Wolff et al., 1990; Eggert-Kruse et al., 1992; Gonzales et al., 1992). Die verminderte Spermiedichte bei ansteigender Leukozytenkonzentration, die andere Autoren beschrieben (Riedel und Semm, 1980; D'Cruz

et al., 1992), konnte nicht bestätigt werden. Als Ursache für einen derartigen Zusammenhang wird angenommen, dass morphologisch geschädigte Spermien (Tomlinson et al., 1992) bzw. Spermien, die Anti-Spermien-Antikörper und Komplementfaktoren (D`Cruz et al., 1992) gebunden haben, von aktivierten neutrophilen Granulozyten phagozytiert werden. Tomlinson et al. (1992) berichteten in diesem Zusammenhang sogar von einer besseren Spermienqualität bei Patienten mit Leukozytospemie.

### **6.1.3 Zusammenhänge zwischen ROS-Produktion und verschiedenen Spermatozoen-Parametern**

Sauerstoffradikale können von jeder Körperzelle generiert werden. Ihre physiologische Funktion besteht in den Spermatozoen in der Induktion der Kapazitation und einer Förderung der Akrosomreaktion (de Lamirande und Gagnon, 1993a, b; de Lamirande et al., 1997b und 1998; Leclerc et al., 1997). ROS scheinen eine wesentliche Rolle beim Erlangen der hyperaktiven Motilität der Spermatozoen zu spielen, die für eine erfolgreiche Penetration der Zona pellucida notwendig ist (de Lamirande und Gagnon, 1993a, b; de Lamirande et al., 1997b und 1998; Leclerc et al., 1997).

Die ROS-Produktion im Ejakulat kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Hauptquelle der ROS-Produktion sind aktivierte Granulozyten (Aitken und West, 1990; Ford, 1990; de Lamirande und Gagnon, 1995), die physiologischerweise bei Abwehrreaktionen eine bedeutende Rolle spielen. Daneben können auch die Spermatozoen selbst reaktive Sauerstoffspezies bilden (Holland et al., 1982; Henkel et al., 1997). Die intrinsische ROS-Produktion erfolgt entweder über eine membranständige NADPH-Oxidase im Mittelstück der Spermatozoen (Aitken et al., 1997; Leclerc et al., 1997) oder über eine mitochondriale NADPH-abhängige Oxidoreduktase im Rahmen der Atmungskette (Gavella et al., 1992). Da die Plasmamembranen von Spermatozoen einen hohen Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren enthalten (Aitken und Clarkson, 1987; Alvarez et al., 1987), sind sie besonders anfällig für oxidativen Stress. Schon geringe ROS-Mengen genügen, um die Spermien nachhaltig zu schädigen (Zorn et al., 2000). Folgen des Einwirkens von Sauerstoffradikalen auf die Spermatozoen sind eine verminderte Fertilität (Aitken et al., 1989; Iwasaki und Gagnon, 1992) und Oolemmabindung der Spermien (Aitken et al., 1989), eine verringerte Penetrationsrate (Aitken und Clarkson, 1988; Vigil et al., 1994), eine niedrigere Spermienmotilität (Aitken und Clarkson, 1988; Aitken und West, 1990; Mortimer, 1991; Krausz et al., 1994; Vigil et al., 1994), ein geringerer Anteil normomorpher Spermien im

Ejakulat (Ollero et al., 2001; Ochsendorf et al., 1994) sowie eine niedrigere Spermiedichte (Ochsendorf, 1994).

Diesbezüglich ist die Wirkung der leukozytären ROS-Produktion von der ROS-Produktion durch die Spermatozoen selbst zu unterscheiden. Während die Sauerstoffradikale der Granulozyten vorwiegend Spermatozoenparameter, die eine intakte Plasmamembran erfordern, beeinträchtigen, schädigen die ROS, die die Spermien selbst produzieren, in erster Linie die Strukturen im Inneren der Spermien. So reduziert beispielsweise eine hohe extrinsische ROS-Produktion deutlicher die Spermienmotilität, als eine hohe intrinsische ROS-Produktion (Ramos und Wetzels, 2001; Giwercman et al., 2003; Henkel et al., 2003a und 2005) und eine exzessive Produktion von Sauerstoffradikalen durch die Spermien selbst schädigt die DNA-Integrität nachhaltiger, als eine massive leukozytäre ROS-Produktion (Lopes et al., 1998b; Irvine et al., 2000; Henkel et al., 2003a und 2005).

Die Ursache für diesen Sachverhalt liegt im Entstehungsort der Sauerstoffradikale begründet. Direkt in den Spermien gebildete freie Radikale wirken auch direkt auf die Zellorganellen der Spermien ein. Demgegenüber wirken extrinsische ROS überwiegend von außen auf die Spermien ein. Um ins Spermieninnere zu gelangen, müssen sie erst die Spermienplasmamembran überwinden, wozu lediglich  $H_2O_2$  in der Lage ist (Tenopoulou et al., 2005). Diese Tatsache erklärt, dass mit ansteigender extrinsischer ROS-Produktion auch die ROS-Produktion durch die Spermien selbst ansteigt (Saleh et al., 2002a; Henkel et al., 2003a und 2005) und sich der Anteil an Spermien mit fragmentierter DNA erhöht (Lopes et al., 1998b; Irvine et al., 2000; Ramos und Wetzels, 2001; Henkel et al., 2003a und 2005).

Der positive Zusammenhang zwischen extrinsischer und intrinsischer Produktion von Sauerstoffradikalen liegt neben der direkten Wirkung der leukozytären ROS auf die Spermien auch in der veränderten Spermatozoenmorphologie begründet. Es ist bekannt, dass eine exzessive extrinsische ROS-Konzentration, die Spermien in frühen Reifungsstadien, beispielsweise im Hoden, trifft, die Spermatozoen morphologisch schädigt. Insbesondere finden sich in solchen Ejakulaten viele Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück, welche in der Regel eine erhöhte intrinsische ROS-Produktion aufweisen.

Schutz vor den schädigenden Einflüssen der Sauerstoffradikale, insbesondere den leukozytären ROS, bietet das Seminalplasma. Es enthält in individuell sehr variablen

Konzentrationen antioxidativ wirksame Bestandteile (Bouvet et al., 1990; Kovalski et al., 1992). Kommt es zu einer Störung des empfindlichen Gleichgewichts zwischen oxidativen und antioxidativen Einflüssen im Seminalplasma mit Überwiegen der oxidativen Bestandteile, so resultiert eine verminderte Fertilität (Sharma et al., 1999; Meucci et al., 2003; Shi et al., 2005). Ursache dafür kann eine exzessive ROS-Produktion ebenso sein, wie eine sekretorische Dysfunktion von Prostata oder Samenblase, die einen wesentlichen Anteil an der totalen antioxidativen Kapazität (TAC) des Seminalplasmas haben. Auch die exogene Zufuhr oxidativ wirkender Stoffe, beispielsweise durch Zigarettenrauchen scheint die TAC des Ejakulates zu vermindern, was ebenfalls eine verminderte Fertilität zur Folge hat (Aitken und Krausz, 2001; Saleh et al., 2002b; Krausz, 2003). Daneben wird in Ejakulaten von infertilen Männern ohne Leukozytospemie, aber mit hohem oxidativen Stress, ein Mangel an IL-10 beobachtet. IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das offensichtlich einen nicht unwesentlichen Anteil an der antioxidativen Kapazität des Seminalplasmas hat. Ein IL-10-Mangel ist in der Regel genetisch bedingt (Miller et al., 2002; Shoskes et al., 2002).

Die beschriebenen Zusammenhänge konnten durch die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen weitgehend bestätigt werden. Es stellte sich ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen extrinsischer ROS-Produktion und der Leukozytenkonzentration im Ejakulat heraus ( $r=0,288$ ;  $P=0,0099$ ;  $n=81$ ). Hauptquelle der extrinsischen ROS-Produktion sind also die Peroxidase-positiven Zellen. Weiterhin wurde eine signifikant negative Korrelation zwischen extrinsischer ROS-Produktion und Spermiovitalität ( $r=-0,254$ ;  $P=0,0231$ ;  $n=81$ ) sowie leukozytärer ROS-Produktion und Spermiedichte ( $r=-0,398$ ;  $P=0,0004$ ;  $n=80$ ) festgestellt. Zwischen der leukozytären Bildung von Sauerstoffradikalen und dem pH-Wert des Ejakulates sowie der Spermienmotilität ließen sich keine signifikanten Korrelationen ermitteln. Ebenfalls gab es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen extrinsischer und intrinsischer ROS-Produktion.

Es konnte ebenso eine signifikante Korrelation zwischen extrinsischer ROS-Produktion und DNA-Fragmentation festgestellt werden ( $r=0,224$ ;  $P=0,0469$ ;  $n=80$ ), wie zwischen intrinsischer ROS-Produktion und DNA-Fragmentation, dort allerdings nur bei der Gruppe der ROS-produzierenden Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück ( $r=0,386$ ;  $P=0,0003$ ;  $n=87$ ). Dabei war die Korrelation zwischen intrinsischer ROS-Produktion und DNA-Fragmentation bei weitem stärker ausgeprägt, als zwischen leukozytärer ROS-Produktion und DNA-Fragmentation, was die Bedeutung der ROS-Produktion durch die Spermien selbst

unterstreicht. Bei der intrinsischen ROS-Produktion stellte sich heraus, dass mit zunehmendem Anteil ROS-produzierender Spermien mit Zytoplasmarest die Spermiedichte ( $r=-0,386$ ;  $P=0,0003$ ;  $n=87$ ) ebenso signifikant abnahm, wie die Motilität (WHO A:  $r=-0,337$ ;  $P=0,0018$ ;  $n=88$ ).

Hinsichtlich der Spermienmorphologie wichen die Ergebnisse von den Erwartungen ab. Hier sank der Anteil der normomorphen Spermien in der Gruppe der ROS-produzierenden Spermien ohne Zytoplasmarest im Mittelstück signifikant ab (Papanicolaou:  $r=-0,3417$ ;  $P=0,0013$ ;  $n=86$ ), während der Anteil an Spermien mit Kopfdeformitäten signifikant zunahm (Papanicolaou:  $r=0,3791$ ;  $P=0,0003$ ;  $n=86$ ). Für die ROS-produzierenden Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück ergaben sich lediglich signifikante Zusammenhänge mit dem Anteil an Spermien mit Schwanzdeformitäten für die Färbungen nach Papanicolaou ( $r=0,257$ ;  $P=0,0173$ ;  $n=87$ ) und Shorr ( $r=0,306$ ;  $P=0,0053$ ;  $n=84$ ). Im Vergleich zwischen extrinsischer und intrinsischer ROS-Produktion zeigte sich, dass die untersuchten Parameter anscheinend stärker durch die Bildung von Sauerstoffradikalen in den Spermien, als in den Leukozyten beeinflusst werden. Die Motilität nahm nur bei steigender intrinsischer ( $r=-0,2398$ ;  $P=0,0244$ ;  $n=88$ ), nicht aber bei steigender extrinsischer ( $r=-0,042$ ;  $P=0,8334$ ;  $n=81$ ) ROS-Produktion signifikant ab, ebenso verhielt es sich mit dem Anteil normomorpher Spermien (intrinsische ROS-Produktion:  $r=-0,276$ ;  $P=0,0097$ ;  $n=87$ ; extrinsische ROS-Produktion:  $r=-0,027$ ;  $P=0,8097$ ;  $n=81$ ). Die DNA-Fragmentation korrelierte ebenfalls stärker mit der intrinsischen ROS-Produktion als mit der extrinsischen, wenngleich beide Werte signifikant waren. Sowohl durch eine steigende extrinsische ROS-Produktion, wie auch durch eine steigende intrinsische ROS-Produktion wurde die Spermiedichte verringert, wobei auch hier die intrinsische ROS-Produktion eine geringfügig höhere Korrelation aufwies ( $r=-0,386$ ;  $P=0,0003$ ;  $n=87$ ) als die extrinsische ( $r=-0,389$ ;  $P=0,0005$ ;  $n=80$ ). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von Henkel et al. (2003a). Ursache dafür dürfte sein, dass die Wirkung der leukozytären ROS durch die antioxidativen Ressourcen des Seminalplasmas gemildert wird (Sharma et al., 1999; Meucci et al., 2003; Shi et al., 2005). Ein zweiter Erklärungsansatz könnte darin bestehen, dass extrinsische ROS, mit Ausnahme von  $H_2O_2$ , aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit die Spermienplasmamembran nicht durchdringen können und so einen geringeren Einfluss auf Strukturen im Spermieninneren haben dürften (Henkel et al., 2003a).

### **6.1.4 Zusammenhänge zwischen der DNA-Fragmentation der Spermien und verschiedenen Spermatozoenparametern**

Spermien mit fragmentierter DNA können im Ejakulat entweder nachgewiesen werden, wenn apoptotische Prozesse eingeleitet, aber nicht abgeschlossen wurden (Sakkas et al., 1999a und 2002), wenn die Spermien nicht vollständig ausgereift sind (McPherson und Longo, 1992) oder wenn die DNA durch reaktive Sauerstoffspezies oxidiert wurde (Agarwal und Saleh, 2002; Henkel et al., 2003a und 2005). Während der zweiten meiotischen Reifeteilung der Spermatiden werden die Histone, um die sich die DNA anordnet, durch Protamine ersetzt. Diese machen in reifen menschlichen Spermien 85 % des Zellkerns aus (Gatewood et al., 1987) und ermöglichen eine 40-fach stärker ausgeprägte DNA-Kondensation, als sie mit Histonen möglich wäre (Kumaroo et al., 1975; Goldberg et al., 1977; Poccia, 1986; Ward und Coffey, 1991). Durch die Verpackung des Chromatins auf kleinstem Raum wird es zum einen möglich, dass es in die Eizelle geschleust werden kann, zum anderen ist die DNA in einem stärker gepackten Zustand besser vor schädigenden Einflüssen geschützt (Clausen et al., 1982; Xavier und Odile, 1991; Engh und Clausen, 1992).

Bei einem mangelhaften Ersatz der Histone durch Protamine kommt es zu einer fehlerhaften Chromatin-Kondensation (Balhorn, 1982; Foresta et al., 1992; Belokopytova et al., 1993; de Yebra et al., 1993) und einer höheren Anfälligkeit der Spermien für eine DNA-Fragmentation (Gorczyca et al., 1993; Sailer et al., 1995; Manicardi et al., 1998). Lücken in den DNA-Strängen kommen im Laufe der Spermienreifung in verschiedenen Stadien physiologischerweise in unterschiedlich starkem Ausmaß vor (Mc Pherson und Longo 1992 und 1993a, b; Sakkas et al., 1995). Sie entstehen durch die Topoisomerase II (McPherson und Longo, 1992), ein Enzym, das eine Schlüsselrolle bei der mitotischen Chromosomenkondensation und -organisation spielt (Cuvier und Hirano, 2003; Sakkas et al., 2003). Die Topoisomerase II verursacht vorübergehende DNA-Doppelstrangbrüche, die für die Doppelhelixbildung der DNA erforderlich sind. Nach stattgefundener Neuordnung der DNA mit Ersatz der Histone durch Protamine (McPherson und Longo, 1992; Chen und Longo, 1996; Hirano, 2002) werden die Lücken in der DNA wieder verschlossen (Wang et al., 1990). Vor allem in der späten Spermienreifung, beim Übergang der runden Spermatiden in elongierte Zellen im Hoden, treten Lücken in der DNA auf (Mc Pherson und Longo 1992 und 1993a, b; Sakkas et al., 1995). Nach abgeschlossener Chromatin-Kondensation sind sie im gesunden Spermium jedoch nicht mehr nachweisbar (Ward und Coffey, 1991; Mc Pherson und Longo 1992 und 1993a, b; Sakkas et al., 1995). Wenn nun viele unreife Spermien ins



Ejakulat gelangen, so findet sich dort auch ein hoher Anteil an Spermien mit fragmentierter DNA, weil die DNA-Brüche, die während der Spermienreifung physiologisch sind, nicht mehr geschlossen werden konnten.

Eine zweite Hypothese besagt, dass ein Großteil der DNA-Fragmentation in Spermien von fehlgeschlagenen apoptotischen Prozessen ausgeht (Steller et al., 1995; Sakkas et al., 1999a und 2002). Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, der von der Zelle, die untergeht, selbst initiiert wird (Kerr et al., 1972). Sie ist gekennzeichnet durch Chromatinkondensation und -fragmentation, Reduzierung der Zellorganellen, ein vermindertes mitochondriales Membranpotential (Luo et al., 1998), eine gesteigerte ROS-Produktion (Whittington et al., 1994), eine Erweiterung des endoplasmatischen Retikulums sowie eine Reduktion des Zellvolumens (Arends und Wyllie, 1991). Die physiologische Funktion der Apoptose besteht in der Herstellung und Aufrechterhaltung der Homöostase im Organismus. Geschädigte, gealterte oder überflüssige Zellen können auf diese Weise eliminiert werden. Das empfindliche Gleichgewicht kann gestört werden, wenn Zellen die Apoptose umgehen, wie es beispielsweise bei der Tumorentstehung oder Autoimmunerkrankungen der Fall ist. Ausgangspunkt für die Theorie der „abortiven Apoptose“ (Sakkas et al., 1999b) ist die Tatsache, dass durch die Teilungsprozesse früher Germinalzellen ein Überschuss an Spermatiden produziert wird. Spermatiden, die morphologische, biochemische oder funktionelle Defekte aufweisen, werden durch Apoptose abgebaut (Allan et al., 1992; Tapanainen et al., 1993; Bartke, 1995; Billig et al., 1995; Furuchi et al., 1996; Rodriguez, 1997; Sinha Hikim et al., 1997).

Im Laufe der Spermatogenese gibt es zwei wesentliche Zeitpunkte, zu denen apoptotische Prozesse ablaufen. Zum einen kommt es kurze Zeit postnatal zu einer sogenannten „ersten Welle“ der Spermatogenese, während der sich Gonozyten zu Spermatogonien differenzieren (Print und Loveland, 2000). Zum anderen kommt es nach der Pubertät durch Gonadotropin- und Androgeneinflüsse zu einer „zweiten Welle“ der Spermatogenese, in der sich aus den Spermatogonien die reifen Spermien entwickeln. In beiden Phasen wird ein Überschuss an Keimzellen produziert, der durch Apoptose auf ein physiologisches Maß reduziert wird (Huckins, 1978; Rodriguez et al., 1997; Blanco-Rodriguez, 1998). Hierfür erfolgt eine Markierung der Zellen, die abgebaut werden sollen, mit Fas, einem Oberflächenprotein, das der Gruppe der Tumornekrosefaktoren angehört. Wenn ein Spermium damit besetzt ist, zeigt es an, dass es geschädigt ist und der Apoptose zugeführt werden kann (Suda et al., 1993;

Krammer et al., 1994; Schulze-Osthoff et al., 1994; Lee et al., 1997). Ein Großteil der Fas-positiven Spermien wird von den Sertoli-Zellen, die Fas-Liganden (FasL) bilden, erfasst und so der Zelltod eingeleitet. Durch die Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor wird die Apoptose in Gang gesetzt (Suda et al., 1993). Das Ausmaß der FasL-Produktion durch die Sertoli-Zellen ist abhängig von der Spermatidendichte. Wenn so viele Spermatiden gebildet werden, dass die Sertoli-Zellen deren Versorgung nicht bewältigen können, wird die FasL-Synthese hochreguliert, so dass defekte Spermien apoptotisch werden (Lee et al., 1997; Rodriguez et al., 1997). Bei Patienten mit einer Oligozoospermie hingegen produzieren die Sertoli-Zellen wenig FasL, weil die Versorgung der Spermatiden auch ohne deren Reduktion gesichert ist. Auf diesem Wege entgehen geschädigte Spermien der Apoptose und gelangen ins Ejakulat (Gorczyca et al., 1993; Baccetti et al., 1996; Sun et al., 1997; Lopes et al., 1998c; Manicardi et al., 1998; Sakkas et al., 1999b). Ebenfalls denkbar wäre, dass defekte, Fas-markierte Spermien nicht abgebaut werden, wenn das exprimierte Fas-Molekül fehlerhaft ist (Sakkas et al., 1999b). Zusammengefasst werden beide Hypothesen als Theorie der „abortiven Apoptose“ (Sakkas et al., 1999b).

Eine dritte Hypothese besagt, dass die DNA-Fragmentation überwiegend ROS-induziert ist (Steller, 1995; Kodama et al., 1997; Lopes et al., 1998b; Irvine et al., 2000). Durch die Sauerstoffradikale unterliegt die DNA Oxidationsvorgängen, die Strangbrüche zur Folge haben, welche mittels des TUNEL-Assays nachgewiesen werden können. Dabei ist auffällig, dass Spermatozoen infertiler Männer empfindlicher für eine ROS-induzierte DNA-Fragmentation durch  $H_2O_2$  sind (Hughes et al., 1996 und 1998) als die Spermien fertiler Männer. Ursache hierfür ist vermutlich ein geringerer Anteil an Antioxidantien im Ejakulat (Pasqualotto et al., 2000b). Ausgeprägte antioxidative Kapazitäten, wie beispielsweise ein hoher Anteil an Vitamin C, Vitamin E und Glutathion, reduzieren den schädigenden Einfluss von ROS auf die DNA (Donnelly et al., 1999 und 2000). Auch der Ursprung der Sauerstoffradikale scheint von Bedeutung für das Ausmaß der DNA-Fragmentation zu sein. So zeigen Studien von Henkel et al. (2003a) und Muratori et al. (2003), dass der Anteil der ROS-produzierenden Spermien stärker mit der DNA-Fragmentation korreliert, als die leukozytäre ROS-Produktion. Erklärungsansätze dafür bestehen zum einen darin, dass in den Spermien selbst produzierte Sauerstoffradikale nicht von den Antioxidantien des Seminalplasmas eliminiert werden können, während das bei den leukozytären ROS schon der Fall ist, zum anderen müssen die intrinsischen ROS nicht erst die Zellmembran der Spermien überwinden, um an der DNA angreifen zu können (Muratori et al., 2003).

Die Folgen eines hohen Anteils an Spermien mit fragmentierter DNA im Ejakulat reichen von einer verminderten Fertilität (Bianchi et al., 1993 und 1996; Manicardi et al., 1995 und 1998; Sakkas et al., 1996; Sun et al., 1997; Lopes et al., 1998c; Sharma et al., 2004; Henkel, 2006) über eine hohe Rate an Frühaborten (Trasler et al., 1985, 1986, 1987; Qiu et al., 1995) bis hin zu potentiellen Schädigungen der Kinder, die aus solchen Keimzellen hervorgehen (Ahmadi et al., 1999) (DNA-Defekte können auf die Nachkommen übertragen werden; Hales et al., 1992). Beispielsweise konnten erhöhte Raten an Krebserkrankungen bei Kindern von rauchenden Vätern festgestellt werden, die ja einem massiven oxidativen Stress ausgesetzt sind (Ji et al., 1997; Aitken et al., 1998; Aitken und Krausz; 2001; Krausz et al., 2003).

In der vorliegenden Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die intrinsische ROS-Produktion in Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück signifikant mit der DNA-Fragmentation korreliert ( $r=0,386$ ;  $P=0,0003$ ;  $n=87$ ). Dies spricht dafür, dass von den Spermien selbst produzierte freie Sauerstoffradikale die DNA schädigen. Für die leukozytäre ROS-Produktion war der Zusammenhang mit der DNA-Schädigung ebenfalls signifikant, wenn auch weniger ausgeprägt ( $r=0,224$ ;  $P=0,0469$ ;  $n=80$ ). Die Leukozytendichte und die DNA-Fragmentation korrelierten nicht signifikant, sondern zeigten nur eine Tendenz. Erwartungsgemäß nahm die DNA-Fragmentation mit zunehmender Leukozytenkonzentration im Ejakulat zu ( $r=0,164$ ;  $P=0,1272$ ;  $n=87$ ). Wie schon bei Sun et al. (1997) beschrieben, sank auch in der vorliegenden Studie der Anteil der motilen Spermien am Ejakulat mit zunehmenden DNA-Schäden signifikant ab ( $r=-0,3584$ ;  $P=0,0007$ ;  $n=87$ ). Der Anteil normomorpher Spermien, der in der Untersuchung von Sun et al. (1997) mit steigender DNA-Fragmentation ebenfalls deutlich abnahm, sank bei den vorliegenden Ergebnissen zwar tendentiell, jedoch nicht signifikant (Shorr:  $r=-0,21$ ;  $P=0,0549$ ;  $n=84$ ). Zwischen DNA-Fragmentation und pH-Wert sowie der Spermindichte konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Signifikant korrelierte jedoch die DNA-Fragmentation mit der Vitalität. Je höher der Anteil an Spermien mit defekter DNA war, umso geringer war der Anteil vitaler Spermien ( $r=-0,4949$ ;  $P<0,0001$ ;  $n=87$ ), so dass ein hoher Anteil an Spermien mit fragmentierter DNA als ursächlich für eine reduzierte Vitalität angesehen werden kann.

Mit Hilfe der ermittelten Ergebnisse lässt sich die These unterstützen, dass die DNA-Fragmentation stark von der ROS-Produktion abhängt. Eine exzessive intrinsische ROS-Produktion, die ja in Spermatozoen mit Zytoplasmarest im Mittelstück besonders hoch ist, korrelierte signifikant mit der DNA-Fragmentation. Ein Zusammenhang zwischen

Spermiendichte und DNA-Fragmentation lag nicht vor, so dass die Annahme, Spermien mit fragmentierter DNA umgehen die Apoptose, weil die Sertoli-Zellen bei einem Spermatiden-Mangel weniger FasL produzierten (Gorczyca et al., 1993; Baccetti et al., 1996; Sun et al., 1997; Lopes et al., 1998c; Manicardi et al., 1998; Sakkas et al., 1999b), nicht gestützt werden kann. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch verschiedene andere Studien. Henkel et al. (2004) fanden keine signifikante Korrelation zwischen Fas-Expression und Spermiendichte, -motilität und Fertilisation. Castro et al. (2004) stellten keine messbaren Konzentrationen des Fas-Proteins in Ejakulaten von Patienten mit und ohne Normozoospermie fest und widersprachen damit der Theorie der abortiven Apoptose. McVicar et al. (2004) und Grunewald et al. (2005) entdeckten keinen Zusammenhang zwischen DNA-Fragmentation bzw. durch oxidativen Stress induzierter Apoptose und Fas-Expression.

## **6.2 Vergleich zwischen verschiedenen Entzündungen des männlichen Genitalsystems**

Es wurde untersucht, ob sich Ejakulate von Patienten mit Entzündung des Genitalsystems von solchen ohne inflammatorische Prozesse in Bezug auf Spermiendichte, -vitalität, -morphologie, -motilität, pH-Wert des Ejakulates, ROS-Produktion und DNA-Fragmentation unterscheiden, ob die genannten Parameter in Ejakulaten mit früher Genitaltraktentzündung von denen mit später Genitaltraktentzündung abweichen und wie sie sich im Vergleich zwischen Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis und MAGI verhalten.

### **6.2.1 Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit und ohne Entzündung des Genitaltraktes**

Wie in vielen Studien bereits nachgewiesen wurde, beeinträchtigen Entzündungen des männlichen Genitalsystems die Qualität des Ejakulates (Sheweita et al., 2005) und schränken die Fertilität ein (Arata de Bellabarba et al., 2000; Sharma et al., 2001). Auch in der vorliegenden Untersuchung zeigte sich, dass eine Infektion sich negativ auf die Spermienqualität auswirkt. Im Vergleich zu den Patienten ohne Genitaltraktentzündung stellte sich bei den Ejakulaten der Patienten mit einer entsprechenden Infektion eine signifikant geringere Motilität (WHO A:  $P=0,0015$ ) heraus. Ähnliche Befunde werden in den Forschungsergebnissen von Yanushpolsky et al. (1996), Arata de Bellabarba et al. (2000), Esfandiari et al. (2002), Saleh et al. (2002a), Aziz et al. (2004a) und Henkel et al. (2005) beschrieben. Des Weiteren war der Anteil normomorpher Spermien am Ejakulat in der Gruppe der Patienten mit Genitaltraktentzündung signifikant niedriger, als in der Vergleichsgruppe (Papanicolaou:  $P=0,0121$ ). Über eine reduzierte Spermatozoenmorphologie

bei Patienten mit Genitaltraktentzündung berichten auch Yanushpolsky et al. (1996), Thomas et al. (1997), Arata de Bellabarba et al. (2000), Alvarez et al. (2002), Esfandiari et al. (2002), Aziz et al. (2004a) sowie Henkel et al. (2005).

Neben der beeinträchtigten Spermienmorphologie und –motilität im Rahmen inflammatorischer Prozesse zeigte sich außerdem eine steigende Tendenz für den Anteil an Spermien mit fragmentierter DNA, die aber nicht signifikant war ( $P=0,0556$ ). Auch in den Arbeiten von Alvarez et al. (2002), Erenpreiss et al. (2002) und Saleh et al. (2002a) wird eine zunehmende DNA-Fragmentation bei Leukozytospermien beschrieben. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ejakulaten der Patienten mit Entzündung und der Vergleichsgruppe fanden sich hinsichtlich pH, ROS-Produktion, Spermindichte und Vitalität. Diese Ergebnisse bezüglich der ROS-Produktion im Ejakulat decken sich nicht mit anderen Veröffentlichungen. Sharma et al. (2001) beschrieben eine erhöhte ROS-Produktion bei Leukozytospermie, Saleh et al. (2002a) fanden eine steigende intrinsische ROS-Produktion mit zunehmender Leukozytenkonzentration und nach Sheweita et al. (2005) ist die ROS-Produktion bei entzündlichen Prozessen der Parameter, der die Spermienfunktionen entscheidend beeinträchtigt. Da auch bei den vorliegenden Ergebnissen eine signifikante Korrelation zwischen Leukozytenkonzentration und leukozytärer ROS-Produktion deutlich wurde ( $r=0,288$ ;  $P=0,0099$ ;  $n=81$ ), liegt ebenfalls ein Unterschied zwischen der ROS-Produktion bei gesunden und entzündlich veränderten Ejakulaten nahe, wenngleich dieser auch nicht signifikant war. Möglicherweise ist dies auf eine zu kleine Stichprobe zurückzuführen. Es ist davon auszugehen, dass an der Schädigung der Spermatozoen die freigesetzten leukozytären Sauerstoffradikale einen erheblichen Anteil haben (Sheweita et al., 2005).

## **6.2.2 Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit Orchitis und anderen**

### **Entzündungen des Genitaltraktes**

In der Gruppe der Patienten mit einer Orchitis ( $n=8$ ) war im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine signifikant geringere Motilität der Spermatozoen nachweisbar (WHO A:  $P=0,0137$ ; WHO B:  $P=0,0005$ ). Dass im Rahmen einer Orchitis die Qualität des Ejakulates abnimmt, beweisen auch andere Studien. Nach Bayasgalan et al. (2004) nehmen Volumen, Motilität, Morphologie und Spermienkonzentration bei einer Entzündung des Hodens ab; Gouletsou et al. (2004) fanden eine reduzierte Spermindichte und –morphologie. Im Vergleich zwischen den Ejakulaten von Orchitis-Patienten mit denen von Patienten mit

anderen Entzündungen (Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis, MAGI) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Leukozytendichte, morphologischen Parametern, pH-Wert des Ejakulates, extrinsischer und intrinsischer ROS-Produktion, Spermiendichte, DNA-Fragmentation, Vitalität und Motilität.

Orchitiden können bakteriellen, viralen oder autoimmunen (Schuppe et al., 2005) Ursprungs sein. Autoimmun-Orchitiden können sich beispielsweise nach Inguinal-Hernien-Operationen entwickeln (Suominen et al., 1995), wenn im Verlauf der Operation die Blut-Hoden-Schranke unterbrochen wurde und ein Kontakt zwischen immunkompetenten Zellen und den Spermatozoen aufgetreten ist. In der Folge können sich Anti-Spermien-Antikörper bilden, die dazu führen, dass Spermiendichte, -morphologie und -motilität abnehmen (Yavetz et al., 1991). Es resultiert eine verminderte Fertilität (Yavetz et al., 1991; Lekili et al., 1992). Auch virale Hodenentzündungen bewirken eine reduzierte Spermiendichte und -motilität (Zeffer und Sauer, 1988). Die häufigste virale Orchitis ist die Mumps-Orchitis (Krieger et al., 1984). Bakteriell induzierte Entzündungen des Hodens entstehen nach Harnwegsinfekten, durch sexuelle Übertragung oder bei systemischen Infektionen (Hermansen et al., 1980) und münden ebenfalls in einer dauerhaft reduzierten Spermiendichte und Fertilität (Osegbe, 1991). Häufigste Erreger sind *Neisseria gonorrhoeae* und *Chlamydia trachomatis* (Rajagopal, 2004).

Immunkompetente Zellen gelangen im Rahmen von Entzündungsprozessen in die Tubuli seminiferi des Hodens, wenn die Blut-Hoden-Schranke unterbrochen wird. Das Interstitium des Hodens enthält auch beim Gesunden eine hohe Anzahl an Makrophagen und Mastzellen (Hermo und Lalli, 1978; Maseki et al., 1981; Hofmann et al., 1983; El-Demiry et al., 1987; Pöllänen und Niemi, 1987; Nagai et al., 1992), die normalerweise strikt von den Tubuli seminiferi getrennt sind (Dym und Fawcett, 1970; Johnson, 1970; Tung et al., 1971). Im Rete testis und den efferenten Hodenductuli verschwindet die Blut-Hoden-Schranke (Pöllänen und Cooper, 1994). In den Epithelien dieser Kanäle und des Rete testis befinden sich T-Suppressor-Zellen (CD8<sup>+</sup>-Zellen), die eine aktive Immunregulation bewirken, so dass autoimmune Angriffe auf die Spermien verhindert werden (El-Demiry et al., 1987; Pöllänen und Cooper, 1994). Die Funktion der Makrophagen im Lumen der Hodentubuli ist die Phagozytose untergegangener, gealterter und defekter Spermien. Gerade bei älteren Männern ist der Anteil an Makrophagen in den Ductuli efferentes gegenüber jüngeren Männern erhöht (Wegelin, 1921; Holstein, 1978), was auf einen physiologischen Alterungsprozess der Spermatozoen zurückzuführen ist (Wolff, 1995).

Bei einer Orchitis kommt es zu einer Störung der Homöostase des Hodens, was sich in einem vermehrten Auftreten von Entzündungszellen, vor allem Makrophagen und Mastzellen, in den Tubuli seminiferi, den Ductuli efferentes und auch im Ejakulat äußert. Auch zytotoxische T-Zellen werden im Rahmen inflammatorischer Prozesse im Ejakulat beobachtet (El-Demiry et al., 1987). Die Folgen des Einwirkens der Entzündungszellen und deren Produkte, insbesondere von Zytokinen und ROS, auf das Hodengewebe können gravierend sein. So wird die Spermatogenese derart beeinträchtigt, dass selbst bei klinisch stummen Orchitiden die Spermiedichte signifikant reduziert ist (Berger et al., 1982; Wolff et al., 1990; Eggert-Kruse et al., 1992; Gonzales et al., 1992). Des Weiteren findet sich bei Hodenentzündungen ein deutlich erhöhter Anteil morphologisch defekter Spermien mit beeinträchtigter Funktionalität (Berger et al., 1982; Eggert-Kruse et al., 1992; Gonzales et al., 1992; Yanushpolsky et al., 1996; Thomas et al., 1997; Menkveld und Kruger, 1998; Aziz et al., 2004a).

Als Ursache dafür wird zum einen eine Schädigung des Hodengewebes durch leukozytäre Sauerstoffradikale (Plante et al., 1994; Aitken et al., 1995a; Ochsendorf, 1999; Gil-Guzman et al., 2001; Ollero et al., 2001; Alvarez et al., 2002), zum anderen eine Beeinträchtigung der Sertoli-Zell-Funktion durch von Entzündungszellen produzierte Zytokine angenommen (Cohen und Pollard, 1995). Insbesondere ein erhöhter Anteil an Spermien mit Zytoplasmarest im Mittelstück bewirkt eine vermehrte ROS-Produktion durch die Spermatozoen selbst (Aitken et al., 1995b, 1996 und 1998; Twigg et al., 1998b; Barroso et al., 2000; Said et al., 2005a). Folge ist eine vermehrte DNA-Fragmentation (Teebor et al., 1988; Alvarez et al., 2002; Agarwal und Said, 2003) mit resultierender Infertilität (Sun et al., 1997; Larson-Cook et al., 2003; Sharma et al., 2004).

### **6.2.3 Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit Epididymitis und anderen**

#### **Entzündungen des Genitaltraktes**

Bei Patienten mit einer Epididymitis nimmt, ähnlich wie bei solchen mit Orchitis, die Qualität des Ejakulates ab. Tozzo (1968) fand bei Epididymitis-Patienten ein reduziertes Ejakulatvolumen, eine verminderte Spermiedichte und -motilität, morphologische Mängel sowie eine geringere Fertilität gegenüber Gesunden. Laut Bayasgalan et al. (2004) sind bei Entzündungen des Nebenhodens Ejakulatvolumen, Spermienmotilität, -morphologie und -konzentration reduziert. In der vorliegenden Untersuchung konnte lediglich eine geringere Spermienmotilität bei Epididymitis-Patienten (n=9) gegenüber Gesunden festgestellt werden

(WHO A:  $P=0,0428$ ). Die anderen Parameter (Spermiendichte, Ejakulatvolumen, pH, Leukozytendichte, Morphologie, ROS-Produktion, DNA-Fragmentation und Vitalität) unterschieden sich weder signifikant von Ejakulaten der Vergleichsgruppe, noch von Ejakulaten von Patienten mit Orchitis, Prostatitis, Vesikulitis oder MAGI. Gerade die verringerte Motilität gegenüber Gesunden ist jedoch typisch für die Epididymitis (Hofmann, 1975; Haidl et al., 1987 und 1990). Ursache hierfür ist eine durch Entzündungsprozesse gestörte Spermienreifung im Nebenhoden, die vor allem die Spermienflagellen betrifft (Haidl et al., 1987). Nachweisbar sind diese Veränderungen in der Färbung nach Shorr, da die geschädigten Flagellen nicht alle Farbstoffe aufnehmen können, die reife Spermischwänze aufnehmen (Haidl et al., 1987). Resultat der Unreife der Flagellen ist ein erhöhter Anteil immotiler Spermien im Ejakulat (Tozzo, 1968; Haidl, 1990; Bayasgalan et al., 2004).

Entzündungen des Nebenhodens, die häufigsten inflammatorischen Prozesse des männlichen Genitaltraktes (Krieger, 1984), sind meist infektiöse oder postinfektiöse aufsteigende Entzündungen (Somekh et al., 2004). Häufigster Erreger bei jungen Männern ist *Chlamydia trachomatis*, gefolgt von *Neisseria gonorrhoeae* (Krieger, 1984; Stav et al., 2003). Bei älteren Männern sind in der Regel gramnegative Bakterien nachweisbar; die Infektionen sind hier meist mit anatomischen Abnormitäten des Vas deferens oder des Nebenhodens vergesellschaftet (Krieger, 1984).

Die Pathogenese der Epididymitis ist ähnlich der der Orchitis. Der Nebenhoden ist beim Gesunden dicht mit Lymphozyten und Makrophagen besiedelt (Holstein, 1969; Dym und Romrell, 1975; Wang und Holstein, 1983; Yeung et al., 1994). Dabei zeigt sich ein charakteristisches Verteilungsmuster der Immunzellen. Ein Großteil der Lymphozyten des epididymalen Epithels sind T-Suppressorzellen, während im Interstitium überwiegend T-Helferzellen ( $CD4^+$ -Zellen) und Makrophagen vorkommen (Ritchie et al., 1984). Auf diese Weise ist eine aktive Immunregulation möglich, durch die autoimmune Angriffe auf die Spermatozoen verhindert werden können (Ritchie et al., 1984). Aufgabe der Makrophagen des Nebenhodens ist die Phagozytose überalterter oder defekter Spermatozoen (Tomlinson et al., 1992). Der Hauptanteil der Makrophagen des männlichen Genitalsystems befindet sich im Bereich des Nebenhodens (Wegelin, 1921; Phadke und Phadke, 1961; Holstein, 1969; Phadke, 1975). Deutlich wird das unter anderem daran, dass vasektomierte Patienten einen wesentlich geringeren Anteil an Immunzellen im Ejakulat haben, als Nicht-Vasektomierte (Olsen und Shields, 1984; Anderson et al., 1990).



Wie bei einer Orchitis auch kommt es bei einer Epididymitis zur Einwanderung von Makrophagen und Lymphozyten ins Nebenhodenlumen und damit zu einer Leukozytospermie. Als relativ spezifischer Marker für eine Epididymitis kann die neutrale  $\alpha$ -Glukosidase angesehen werden, die eine Abgrenzung der Nebenhodenentzündung von anderen inflammatorischen Prozessen des Genitalsystems ermöglicht (Chapdelaine et al., 1978; Guerin et al., 1981; Cooper et al., 1990b). Diese Unterscheidung kann sich teilweise schwierig gestalten; häufig ist eine Epididymitis auch mit einer Prostatitis assoziiert (Hofmann, 1975). Dabei ist es klinisch bedeutsam, die Nebenhodenentzündung von der Entzündung der Prostata abzugrenzen, da die Schädigung der Spermatozoen im Rahmen einer Epididymitis schwerwiegender zu sein scheint (Hofmann, 1975; Comhaire et al., 1980), als durch eine Prostatitis (Hofmann, 1975). Dies trifft insbesondere hinsichtlich der Spermienmotilität zu (Haidl et al., 1987 und 1990).

#### **6.2.4 Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit Prostatitis und anderen Entzündungen des Genitaltraktes**

Die Prostatitis wird nach NIH-Kriterien in 4 Kategorien eingeteilt (Tabelle 27), die von Litwin et al. (1999) als gut geeignet zur Abgrenzung verschiedener Formen chronischer Entzündungen der Prostata eingestuft wurden. In diversen Veröffentlichungen wurde der Einfluss einer Prostatitis auf verschiedene Ejakulatparameter beschrieben. Beispielsweise fanden sich bei einer Prostatitis signifikant erhöhte Leukozytenkonzentrationen im Ejakulat (Weidner et al., 1991; Krieger et al., 1996), eine verminderte Spermiedichte gegenüber Gesunden (Giamarellou et al., 1984; Christiansen et al., 1991; Huijin et al. 1998; Menkveld et al., 2003b; Henkel et al., 2006), eine reduzierte Spermienmotilität (Caldamone et al., 1980; Giamarellou et al., 1984; Christiansen et al., 1991; Leib et al., 1994; Krieger et al., 1996), morphologische Schädigungen der Spermatozoen (Giamarellou et al., 1984; Christiansen et al., 1991; Leib et al., 1994; Menkveld et al., 2003b; Motrich et al., 2005; Henkel et al., 2006), ein signifikant geringerer Anteil vitaler Spermien (Christiansen et al., 1991; Huijin et al., 1998) und eine reduzierte Fähigkeit der Spermien zur Akrosomreaktion (Henkel et al., 2006).

Da die Akrosomreaktion eine Funktion der Spermatozoenplasmamembran ist, liegt nahe, dass die Lipidperoxidation durch freigesetzte Sauerstoffradikale im Rahmen einer Prostatitis (Pasqualotto et al., 2000a) eine entsprechende Schädigung bewirkt. In diesem Zusammenhang ist sogar von einer Gefährdung der Fertilität durch eine Prostatitis auszugehen (Potts und Pasqualotto, 2003). Des Weiteren ist eine erhöhte Zytokinproduktion für die pathologischen

Veränderungen des Ejakulates bei Prostatitis-Patienten als ursächlich bedeutend anzusehen (Alexander et al., 1998; Nadler et al., 2000; Jang und Schaeffer, 2003). Auch eine sekretorische Dysfunktion im Rahmen von Prostatitiden wurde festgestellt. Der pH-Wert des Ejakulates stieg an, erhöhte Immunglobulinkonzentrationen waren vorhanden, Zink-, Magnesium-, Calcium-, Citrat- und Cholesterolspiegel sanken und auch die Enzymkonzentrationen nahmen ab (Weidner et al., 1999). Da im Rahmen dieser sekretorischen Dysfunktion auch die antioxidative Kapazität (TAC) des Ejakulates reduziert wird, ist anzunehmen, dass neben der erhöhten ROS-Produktion auch ein stärkerer schädigender Einfluss der Sauerstoffradikale auf die Spermatozoen vorliegt (Sikka, 2001). Comhaire et al. (1986) beschrieben einen sinkenden  $\gamma$ -Glutamyltransferasespiegel sowie einen reduzierten Fruktosegehalt des Ejakulates bei Prostatitis-Patienten.

**Tabelle 27:** NIH-Kategorien der Prostatitis.

Kategorie	Kennzeichen
I	Akute bakterielle Prostatitis
II	Chronisch bakterielle Prostatitis
III	Chronisch abakterielle Prostatitis (chronischer Beckenschmerz, keine Bakterien im Ejakulat nachweisbar)
IIIa	Entzündlicher chronischer Beckenschmerz (Leukozytospemie im Ejakulat oder Prostatasekret)
IIIb	Nichtentzündlicher chronischer Beckenschmerz (Prostatodynie; keine Leukozytospemie im Ejakulat)
IV	Asymptomatische Prostatitis (Zufallsbefund)

Physiologischerweise befinden sich im Interstitium der Prostata relativ hohe Konzentrationen an T- und B-Lymphozyten (El-Demiry et al., 1985). Letztere scheinen eine Quelle sekretorischer Immunglobuline im Ejakulat zu sein (El-Demiry et al., 1985). Granulozyten stellen den Hauptanteil der weißen Blutzellen in Ejakulaten vasktomierter Patienten (Anderson et al., 1990), so dass Prostata und Samenblase den wesentlichen Anteil an Granulozyten im Genitalsystem zu enthalten scheinen (Wolff, 1995). Im Rahmen von Entzündungsprozessen der Prostata gelangen Granulozyten ins Ejakulat. Als chemischer Marker kann die Zitronensäure verwendet werden (Comhaire et al., 1989), die spezifisch bei einer Prostatitis reduziert ist (Nikkanen et al., 1979; Comhaire et al., 1980; Cooper et al., 1990a; Wolff et al., 1991). Die Prostatitis stellt eine häufige Genitaltraktentzündung dar, die auch klinisch stumm verlaufen kann. Sie wurde gehäuft in Ejakulaten infertiler Patienten mit

Leukozytospemie nachgewiesen (Branigan und Muller, 1994), so dass neben einer verminderten Ejakulatqualität (Wolff et al., 1991; Leib et al., 1994) auch eine Reduktion der Fertilität betroffener Männer angenommen werden muss (Branigan und Muller, 1994).

In der durchgeführten Untersuchung konnte nicht bestätigt werden, dass sich die Ejakulatqualität bei einer Prostatitis gegenüber Gesunden entscheidend verschlechtert. Es zeigten sich im Vergleich zwischen der Prostatitisgruppe und der Vergleichsgruppe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Parameter Leukozytendichte, Spermienmorphologie, pH-Wert des Ejakulates, extrinsischer und intrinsischer ROS-Produktion, Spermindichte, DNA-Fragmentation, Vitalität und Motilität. Das mag zum einen daran liegen, dass bei der relativ kleinen Patientengruppe (n=12) die Diagnose „Prostatitis“ vordergründig anhand klinischer Befunde gestellt wurde, zum anderen beschrieben auch andere Arbeiten keine signifikanten Unterschiede zwischen Prostatitis-Ejakulaten und Gesunden im Hinblick auf Spermindichte (Weidner et al., 1991; Leib et al., 1994; Krieger et al., 1996; Pasqualotto et al., 2000), Motilität (Weidner et al., 1991; Pasqualotto et al., 2000; Henkel et al., 2006), Morphologie (Weidner et al., 1991; Krieger et al., 1996; Pasqualotto et al., 2000) und Vitalität (Leib et al., 1994; Henkel et al., 2006). Im Vergleich zu den Ejakulaten der Prostatitis-Patienten und denen der Patienten mit Orchitis, Epididymitis, Vesikulitis und MAGI zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

#### **6.2.5 Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit Vesikulitis und anderen**

##### **Entzündungen des Genitaltraktes**

Entzündungen der Samenblase treten gehäuft bei Patienten mit Divertikeln im Bereich des Vas deferens auf (Dunnick et al., 1982). Vesikulitis und Epididymitis kommen oft zusammen vor; Erreger ist dann meist *Chlamydia trachomatis* (Krishnan und Heal, 1991; Furuya et al., 2004). Auch für die Vesikulitis liegen Studien vor, die eine reduzierte Ejakulatqualität durch die entzündlichen Prozesse (Cavalieri und van Camp, 1997) und damit verbunden eine erhöhte Infertilität (Indudhara et al., 1991) beschreiben. Die vorliegenden Ergebnisse können das nicht bestätigen. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ejakulaten von Patienten mit Vesikulitis (n=8) und denen ohne Entzündung bezüglich aller untersuchten Parameter. Ebenso wenig konnten Unterschiede zwischen den Ejakulaten von Patienten mit Vesikulitis und denen von Patienten mit anderen Entzündungen des Genitalsystems festgestellt werden.

Beim Gesunden ist der Anteil der weißen Blutzellen im Ejakulat, der aus der Samenblase kommt, gering (Simbini et al., 1998). Es finden sich nur geringe Konzentrationen von Immunzellen in den Epithelien und dem Interstitium der Glandula seminalis (El-Demiry et al., 1985). Ursache dafür ist möglicherweise die Tatsache, dass in der Samenblase hohe Konzentrationen immunsuppressiver Substanzen gebildet werden, die die Aktivierung und Akkumulation von weißen Blutzellen hemmen (Aumüller und Riva, 1992). Im Rahmen einer Vesikulitis, die meist mit Prostatitis (Comhaire et al., 1980; Gonzales et al., 1992) und/oder Epididymitis (Vicari, 2000) vergesellschaftet ist, kommt es neben einer Leukozytospemie zu einer Erniedrigung des für die Samenblase spezifischen Markers Fruktose (Mann, 1948; Mann und Lutwak-Mann, 1981). Wegen der sekretorischen Dysfunktion, beispielsweise der mangelnden Energieversorgung der Spermien durch den Fruktosemangel oder das Fehlen antiinflammatorischer Zytokine, die beim Gesunden im Sekret der Glandula seminalis enthalten sind, resultiert eine funktionelle Beeinträchtigung der Spermien (Cooper et al., 1990a; Wolff et al., 1991; Gonzales et al., 1992; Vicari 2000). So zeigen Untersuchungen verschiedener Genitaltraktentzündungen, dass eine reine Prostatitis milder verläuft und besser auf eine antibiotische Therapie anspricht, als eine Prostatovesikulitis (Vicari, 2000). Der Schutz der Spermatozoen durch das Sekret der Samenblase mit seinen antioxidativen Komponenten ist demzufolge nicht zu unterschätzen und scheint für die Integrität der Spermienfunktion von wesentlicher Bedeutung zu sein. Eine weitere pathogenetisch nicht unwichtige Rolle spielt bei der Vesikulitis, wie bei allen anderen Genitaltraktentzündungen auch, die direkte Schädigung der Spermien durch Mikroorganismen (Gnarpe und Friberg, 1973; Swenson et al., 1979), Zytokine (Bar-Chama und Fisch, 1993) und ROS (Wang et al., 1997; Vicari, 1999). Möglicherweise wird durch eine Vesikulitis sogar die Fertilität vermindert, was sich daran zeigt, dass sich nach antibiotischer Behandlung infertiler Männer mit Prostatovesikulitis die Entstehungsrate von Schwangerschaften der Partnerinnen der erkrankten Männer erhöht (Vicari, 2000).

## **6.2.6 Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit MAGI und anderen**

### **Entzündungen des Genitaltraktes**

In der Patientengruppe mit MAGI (n=13) konnten deutliche Unterschiede zu den Ejakulaten von Gesunden festgestellt werden. Der Anteil normomorpher Spermien am Ejakulat war bei den Patienten mit Entzündung im Genitaltrakt signifikant niedriger als bei den Gesunden (Papanicolaou:  $P=0,0263$ ), während der Anteil an Spermatozoen mit Mittelstückdeformitäten deutlich höher lag (Papanicolaou:  $P=0,0181$ ). Des Weiteren war die extrinsische ROS-

Produktion in entzündlich veränderten Ejakulaten signifikant höher, als in der Vergleichsgruppe ( $P=0,0152$ ), die Spermiedichte hingegen deutlich geringer ( $P=0,0248$ ). Auch der Anteil an Spermien mit DNA-Fragmentation war bei den MAGI-Patienten höher, als bei den Gesunden ( $P=0,0046$ ). Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit denen anderer Studien. Weidner et al. (1999) beschrieben eine reduzierte Spermiedichte, eine verminderte Motilität, morphologische Deformitäten sowie eine erhöhte Leukozytendichte und ROS-Produktion. Vicari (2000) sprach bei Entzündungen von einer erhöhten ROS-Produktion und Leukozytendichte, während Spermiedichte und Fertilität abnahmen. Dohle (2003) wiederum beschrieb, dass bei MAGI-Patienten Spermienkonzentration, -motilität- und morphologie reduziert sind. Nach Diemer et al. (2003) nahm bei Entzündungen die Spermienmotilität ab, während Krause et al. (2003) von einer erhöhten Leukozytenkonzentration und extrinsischen ROS-Produktion im Rahmen von MAGI berichteten. In Folge dieser Mängel haben Patienten mit MAGI auch eine geringere Fertilität (Depuydt et al., 1998; Comhaire et al., 1999; Diemer et al., 2000; Everaert et al., 2003). Im Gegensatz dazu zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ejakulaten von Patienten mit MAGI und denen von Patienten mit anderen Entzündungen (Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis) im Hinblick auf alle untersuchten Parameter.

Der Pathomechanismus der Spermenschädigung im Rahmen von MAGI wird kontrovers diskutiert. Nicht immer sind Entzündungszellen im Ejakulat nachweisbar, insbesondere bei chronischen Prostatitiden (Stadium NIH IIb). Trotzdem ist bei diesen Patienten die Ejakulatqualität oft schlechter als bei Gesunden (Hochreiter, 2001). Ein weiterer Diskussionspunkt ist, dass sich bei MAGI-Patienten auch nach erfolgreicher antibiotischer Therapie, also nach Verschwinden der Bakterio- und/oder Leukozytospermie, die Ejakulatparameter häufig nicht entscheidend verbessern (Vicari, 1999 und 2000). Dabei scheint von Bedeutung zu sein, ob die Entzündung auf die Prostata beschränkt ist, zusätzlich auf die Samenblasen ausgedehnt ist oder sogar den Nebenhoden mit einbezieht (Vicari, 2000). Im Hinblick auf die Fertilität haben die Entzündungen, die auf die Prostata beschränkt bleiben, die beste Prognose, während kompliziertere Entzündungen, vor allem solche, die den Nebenhoden mit einbeziehen, nur schwer erfolgreich therapierbar sind (Vicari, 2000).

Neben der schädigenden direkten Wirkung der Entzündungszellen auf die Spermien scheint es weitere Mechanismen zu geben, die die Ejakulatqualität negativ beeinflussen. So werden bei Patienten mit abakteriellen Prostatitiden und ohne Leukozytospermie autoimmune Prozesse

vermutet (Alexander et al., 1997; Ponniah et al., 2000; John et al., 2001), es werden erhöhte ROS-Level im Ejakulat gefunden (Aitken, 1989; Kovalski et al., 1991; Aitken et al., 1992; Kessopoulou et al., 1992; Vicari, 1997 und 1999; Wang et al., 1997) und inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 oder IL-8 sind erhöht (Bar-Chama und Fisch, 1993; Alexander et al., 1998; Nishimura et al., 1998; Omu et al., 1998; Hochreiter et al., 2000; Nadler et al., 2000). Weiterhin ist die Sekretionsleistung von Prostata und Samenblase, messbar an den Konzentrationen an  $\alpha$ -Glukosidase und Zitronensäure im Ejakulat, vermindert. Folge dessen ist eine reduzierte totale antioxidative Kapazität (TAC) des Seminalplasmas (Cooper et al., 1990a; Wolff et al., 1991; Gonzales et al., 1992; Ochsendorf, 1999; Vicari 2000).

Um das Ausmaß des oxidativen Stresses einschätzen zu können, wurde der ROS-TAC-Score eingeführt. Er berücksichtigt sowohl die Konzentration von Sauerstoffradikalen im Ejakulat, wie auch die antioxidativen Ressourcen des Seminalplasmas. Ein hoher Wert spricht für das Vorliegen ausreichender protektiver Kapazitäten während bei einem niedrigen Level die Sauerstoffradikale überwiegen und so ein hohes Ausmaß oxidativen Stresses vorhanden ist. Der ROS-TAC-Score ist ein empfindlicher Indikator für beispielsweise die Fertilität (Sharma et al., 1999; Shi et al., 2005). Unabhängig von der Ursache eines unerfüllten Kinderwunsches zeigten sich bei infertilen Männern deutlich niedrigere TAC- und höhere ROS-Werte, also niedrigere ROS-TAC-Level, als bei fertilen Männern (Pasqualotto et al., 2000b). Neben der Infertilitätsdiagnostik eignet sich der ROS-TAC-Score auch zur Prostatitis-Diagnostik. Bei Männern mit chronischer Prostatitis fanden sich regelmäßig niedrige Werte, unabhängig davon, ob eine Leukozytospemie vorlag oder nicht (Pasqualotto et al., 2000a). So erscheint der ROS-TAC-Score als besser geeignetes Messinstrument zur Feststellung des oxidativen Stresses von Spermien als ROS- oder TAC-Werte alleine (Sharma et al., 1999) oder die Leukozytenkonzentration. Sharma et al. (2001) stellten in diesem Zusammenhang fest, dass jedes Auftreten von Leukozyten im Ejakulat, auch unterhalb des WHO-Grenzwertes von  $1 \times 10^6$  Mio/ml, zu einem erniedrigten ROS-TAC-Score führt, so dass die Messung des oxidativen Stresses als effektivere Methode imponiert und der WHO-Grenzwert noch einmal überdacht werden sollte.

### **6.2.7 Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit frühen und späten**

#### **Entzündungen des Genitaltraktes**

Da bei den einzelnen untersuchten Entzündungen die Fallzahlen recht klein waren und die Ergebnisse so nicht mit letzter Sicherheit als statistisch relevant angesehen werden können, wurde eine Einteilung in frühe und späte Entzündungen des männlichen Genitaltraktes vorgenommen. Zu den frühen Entzündungen wurden Orchitis und Epididymitis, zu den späten Prostatitis, Vesikulitis und Urethritis gezählt. Auch im Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen konnten interessanterweise keine signifikanten Unterschiede bezüglich Leukozytendichte, morphologischen Parametern, pH-Wert des Ejakulates, extrinsischer und intrinsischer ROS-Produktion, Spermindichte, DNA-Fragmentation, Vitalität und Motilität festgestellt werden. Folglich ist davon auszugehen, dass die Spermien relativ unabhängig vom Ursprung der Entzündung und der Einwirkdauer der Leukozyten bzw. deren Produkten geschädigt werden. Ursache dafür dürfte die hohe Reaktivität der Sauerstoffradikale sein, deren Halbwertszeiten sich im Milli- bis Nanosekundenbereich bewegen. So ist  $H_2O_2$  die einzige ROS-Spezies, die aufgrund einer etwas längeren Halbwertszeit (Millisekunden) die Plasmamembranen der Spermien durchdringen und auch Strukturen im Inneren der Spermien, insbesondere die DNA (Lopes et al., 1998b; Irvine et al., 2000; Ramos und Wetzels, 2001; Henkel et al., 2003a und 2005), schädigen kann. Alle anderen ROS-Spezies sind so instabil, dass sie zerfallen, bevor sie die Membranen permeieren können. Sie können die Spermienmembranen entsprechend auch nur von außen angreifen und so beispielsweise eine reduzierte Motilität der Spermatozoen bewirken (Ramos und Wetzels, 2001; Giwercman et al., 2003; Henkel et al., 2003a und 2005). Dabei spielt es nur eine untergeordnete Rolle, von welcher Stelle des Genitalsystems die Entzündung ihren Ursprung nimmt; das Schädigungsmuster der Spermien ist offensichtlich eher auf die Reaktivität und Instabilität der ROS zurückzuführen, als auf die Dauer des Kontaktes der Spermien zu den Entzündungszellen. Auffällig ist, dass bei Orchitis und Epididymitis die Qualität der Ejakulate im Vergleich zu Gesunden reduziert war, während dies bei den anderen Entzündungen nicht der Fall war. Es ist demnach nicht ausgeschlossen, dass bei frühen Genitaltraktentzündungen eine stärkere Schädigung der Spermatozoen erfolgt, als bei späten, wenngleich diese Unterschiede weniger deutlich ausfallen, als erwartet. Damit bestätigen die in dieser Arbeit erhobenen Befunde die Annahme von Ochsendorf (1999).

## 7. Schlussfolgerungen

Es zeigte sich, dass mit zunehmender Leukozytenkonzentration im Ejakulat die extrinsische ROS-Produktion deutlich anstieg. Hauptquelle der extrinsischen ROS-Produktion sind folglich die Leukozyten. Mit einer ansteigenden extrinsischen Produktion von Sauerstoffradikalen nahmen Spermiedichte sowie -vitalität signifikant ab und die DNA-Fragmentation zu, während mit ansteigender ROS-Produktion durch die Spermien selbst der Anteil normomorpher Spermien abnahm, die Motilität reduziert war und die DNA-Fragmentation anstieg. Dabei stellte sich heraus, dass die DNA-Fragmentation stärker von der intrinsischen als von der extrinsischen ROS-Produktion beeinflusst wird. Die Wirkung der granulozytären ROS-Produktion scheint durch antioxidative Ressourcen des Seminalplasmas abgeschwächt zu werden und beeinflusst in hohen Konzentrationen in erster Linie die Spermiedichte und das Überleben der Spermatozoen. Eine hohe intrinsische ROS-Produktion beeinträchtigt vor allem funktionelle Spermatozoenparameter, was wohl auf den Entstehungsort im Spermium selbst mit fehlenden antioxidativen Kapazitäten zurückzuführen ist.

Im Vergleich zwischen den Ejakulaten von Patienten mit und ohne Entzündung des Genitalsystems stellte sich heraus, dass bei Patienten mit einer Entzündung die Spermienmotilität signifikant reduziert war und die Spermienmorphologie deutlich in Mitleidenschaft gezogen wurde. Genitaltraktentzündungen bewirken folglich eine reduzierte Spermienqualität. Zwischen frühen (Orchitis, Epididymitis) und späten (Prostatitis, Vesikulitis) Entzündungen fanden sich keine deutlichen Unterschiede, ebensowenig im Vergleich zwischen den einzelnen Entzündungen (Orchitis, Epididymitis, Prostatitis, Vesikulitis, MAGI). Signifikante Unterschiede zeigte der Vergleich zwischen Ejakulaten von Patienten mit Orchitis bzw. Epididymitis und der Kontrollgruppe. Bei den Orchitis- und Epididymitisejakulaten war die Spermienmotilität schlechter, als bei der Kontrollgruppe. Bei Prostatitis und Vesikulitis ließen sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe feststellen. In diesen Ergebnissen zeigt sich, dass bei frühen Entzündungen des Genitaltraktes die Spermienqualität deutlicher reduziert zu sein scheint, als bei späten Entzündungen. Allerdings wurde dieser Unterschied nur im Vergleich der einzelnen Entzündungen mit der Kontrollgruppe deutlich, nicht jedoch im direkten Vergleich zwischen Orchitis bzw. Epididymitis mit Prostatitis bzw. Vesikulitis. Demzufolge kommt tendentiell den frühen Genitaltraktentzündungen eine größere Bedeutung zu, als den späten; allerdings weniger



ausgeprägt, als aufgrund der längeren Einwirkdauer der ROS erwartet. Ursache hierfür ist vermutlich die hohe Reaktivität der Sauerstoffradikale mit Halbwertzeiten im Nano- bis Millisekundenbereich, was innerhalb kürzester Zeit schwere Störungen der Integrität der Zellen bewirken kann. Folglich ist jede Genitaltraktentzündung potentiell schädlich für die Ejakulatqualität und die Fertilität und sollte adäquat therapiert werden. Aufgrund der relativ geringen Fallzahlen bei den einzelnen Entzündungen muss die Allgemeingültigkeit dieser Beobachtungen als eingeschränkt angesehen werden und sollte Anlass zu weiteren Untersuchungen geben.

## 8. Literaturverzeichnis

- Agarwal A, Saleh RA. 2002. Role of oxidants in male infertility: rational, significance and treatment. *Urol Clin N Am* 29:817-827
- Agarwal A, Said T. 2003. Role of sperm-chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 9:331-345
- Ahmadi A, Ng SC. 1999. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 284:696-704
- Aiman J, Brenner PF, MacDonald PC. 1980. Androgen and estrogen production in elderly men with gynecomastia and testicular atrophy after mumps orchitis. *J Clin Endocrinol Metab* 50:380-386
- Aitken RJ. 1989. The role of free oxygen radicals and sperm function. *Int J Androl* 12:95-97
- Aitken RJ, Baker W. 1995. Seminal leukocytes; passengers, terrorists or good Samaritans?. *Hum Reprod* 10:1736-1739
- Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW, Irvine DS. 1995a. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum Reprod* 10:2061-2071
- Aitken RJ, Buckingham DW, Harkiss D, Paterson M, Fisher H, Irvine DS. 1996. The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa is influenced by redox regulated changes in tyrosine phosphorylation during capacitation. *Mol Cell Endocrinol* 117:83-93
- Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW. 1992. Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fertil* 94:451-462
- Aitken RJ, Clarkson JS. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81:459-469
- Aitken RJ, Clarkson JS. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 9:367-376

- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 41:183-197
- Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S. 1997. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev* 47:468-482
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59:1037-1046
- Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC. 1991. Prospective analysis of sperm-ooocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 164:542-551
- Aitken RJ, Krausz C. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122:497-506
- Aitken J, Krausz C, Buckingham D. 1994a. Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev* 39:268-279
- Aitken RJ, Mark A. 1989. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *Int J Androl* 4:191-194
- Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M. 1995b. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 108:2017-2025
- Aitken RJ, West KM. 1990. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl* 13:433-451
- Aitken RJ, West K, Buckingham D. 1994b. Leukocytic infiltration in the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function. *J Androl* 15:343-352

- Alastalo TP, Lonnstrom M, Leppa S, Kaarniranta K, Peltö-Huikko M, Sistonen L, Parvinen M. 1998. Stage-specific expression and cellular localization of the heat shock factor 2 isoforms in the rat seminiferous epithelium. *Exp Cell Res* 240:16-27
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1990. *Molekularbiologie der Zelle*. 2. Auflage. Weinheim, Basel, Cambridge, New York: VCH-Verlag
- Alexander RB, Brady F, Ponniah S. 1997. Autoimmune prostatitis: evidence of T cell reactivity with normal prostatic proteins. *Urology* 50:893-899
- Alexander RB, Ponniah S, Hasday J, Hebel JR. 1998. Elevated levels of proinflammatory cytokines in the semen of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Urology* 52:744-749
- Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA. 1992. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Proliferation* 25:241-250
- Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ Jr, Evenson DP, Agarwal A. 2002. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 78:319-329
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blaso L, Storey BT. 1987. Spontaneous lipidperoxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 8:338-348
- Anderson DJ, Wolff H, Zhang W, Pudney J. 1990. Immunology of the male reproductive tract: implications for the sexual transmission of human immunodeficiency virus. In: Voeller B, Reinisch JM, Gottlieb M (Hrsg.). *AIDS and sex. An integrated biomedical and biobehavioral approach*. New York, Oxford: Oxford University Press, 311-333
- Arata de Bellabarba G, Tortolero I, Villarroel V, Molina CZ, Bellabarba C, Velazquez E. 2000. Nonsperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. *Arch Androl* 45:131-136
- Arends M, Wyllie A. 1991. Apoptosis: mechanism and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32:223-254
- Aumüller G, Riva A. 1992. Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia* 24:183-196

- Auroux M, Collin C, Couvillers ML. 1985. Do nonspermatozoal cells mainly stem from spermatogenesis? Study of 106 fertile and 102 subfertile men. *Arch Androl* 14:73-80
- Austin CR. 1960. Capacitation and release of hyaluronidase from spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1:310-311
- Austin CR, Bishop MWH. 1958. Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc R Soc Lond (Biol)* 149:241-248
- Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ Jr. 2004a. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril* 82:621-627
- Aziz N, Buchan I, Taylor C, Kingsland CR, Lewis-Jones I. 1996. The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. *Fertil Steril* 66:1000-1008
- Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 2004b. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril* 81:349–354
- Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. 1996. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 28:587–596
- Balhorn R. 1982. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 93:298–305
- Baltz JM, Williams PO, Cone RA. 1990. Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol Reprod* 43:485-491
- Bar-Chama N, Fisch H. 1993. Infection and pyospermia in male infertility. *World J Urol* 11:76-81
- Barrat CLR, Bolton AE, Cooke ID. 1990. Functional significance of white blood cells in the male and the female reproductive tract. *Hum Reprod* 5:639-648
- Barros C, Bedford JM, Franklin LE, Austin CR. 1967. Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J Cell Biol* 34:C1-C5
- Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15:1338-1344

- Bartke A. 1995. Apoptosis of male germ cells a generalized or a cell typespecific phenomenon? *Endocrinology* 136:3–4
- Batstone GR, Doble A. 2003. Chronic prostatitis. *Curr Opin Urol* 13:23-29
- Bayasgalan G, Naranbat D, Radnaabazar J, Lhagvasuren T, Rowe PJ. 2004. Male infertility: risk factors in Mongolian men. *Asian J Androl* 6:305-311
- Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M. 1991. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med* 173:771-774
- Beard CM, Benson RC Jr, Kelalis PP, Elveback LR, Kurland LT. 1977. The incidence and outcome of mumps orchitis in Rochester, Minnesota, 1935 to 1974. *Mayo Clin Proc* 52:3-7
- Bedford JM. 1994. The status and state of the human epididymis. *Hum Reprod* 9:2187-2199
- Belokopytova IA, Kostyleva EI, Tomilin AN, Vorob'ev VI. 1993. Human male infertility may be due to a decrease of the protamine p2 content of sperm chromatin. *Mol Reprod Dev* 34:53–57
- Berger RE, Karp LE, Williamson RA, Koehler J, Moore DE, Holmes KK. 1982. The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as rejected in the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 37:557-564
- Berger RE, Smith WD, Critchlow CW, Stenchever MA, Moore DE, Spadoni LR, Holmes KK. 1983. Improvement in the sperm penetration (hamster ova) assay (SPA) results after doxycycline treatment of infertile men. *J Androl* 4:126-130
- Bertschat FL, Alexander M. 1981. Infertility after mumps orchitis. *MMW Munch Med Wochenschr* 123:606-608
- Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. 1993. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 49:1083–1088
- Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Campana A, Bianchi U, Sakkas D. 1996. The use of the GC specific fluorochrome chromomycin A3 (CMA3) as an indicator of poor sperm quality. *J Assist Reprod Gen* 13:246–250

- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJW. 1995. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136:5–12
- Blanco-Rodriguez J. 1998. A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. *Int J Androl* 21:236-248
- Bouvet JP, D`Azambuja S, Roux C, Lebrun L, Pillot J. 1990. Human seminal plasma suppresses the chemiluminescence of polymorphnuclears without modifying phagocytosis. *Am J Reprod Immunol* 23:64-68
- Bradshaw CS, Tabrizi SN, Read TR, Garland SM, Hopkins CA, Moss LM, Fairley CK. 2006. Etiologies of nongonococcal urethritis: bacteria, viruses, and the association with orogenital exposure. *J Infect Dis* 193:336-345
- Branigan EF, Muller CH. 1994. Efficacy of treatment and recurrence rate of leukocytospermia in infertile men with prostatitis. *Fertil Steril* 62:580-584
- Brewer L, Corzett M, Balhorn R. 2002. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J Biol Chem* 277:38895-38900
- Buch JP, Kolon TF, Maulik N, Kreutzer DL, Das DK. 1994. Cytokines stimulate lipid membrane peroxidation of human sperm. *Fertil Steril* 62:186-188
- Burkman LJ. 1990. Hyperactivated motility of human spermatozoa during in vitro capacitation and implication for fertility. In: Gagnon C (Hrsg.). *Controls of sperm motility: Biological and clinical aspects*. Boca Raton: CrC Press, 303-329
- Caldamone AA, Emilson LBV, Al-Juburi A, Cockett ATK. 1980. Prostatitis: Prostatic secretory dysfunction affecting fertility. *Fertil Steril* 34:602-603
- Castro A, Parodi D, Morales I, Madariaga M, Rios R, Smith R. 2004. Absence of Fas protein detection by flow cytometry in human spermatozoa. *Fertil Steril* 81:1019-1025
- Cavalieri J, van Camp SD. 1997. Bovine seminal vesiculitis. A review and update. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13:233-241
- Chan PJ, Su BC, Tredway DR, Whitney EA, Pang SC, Corselli J, Jacobson JD. 1994. White blood cells in semen affect hyperactivation but not sperm membrane integrity in the head and tail regions. *Fertil Steril* 61:986-989
- Chapdelaine P, Tremblay RR, Dube JY. 1978. P-nitrophenol-a-d-glucopyranoside as substrate for measurement of malatase activity in human semen. *Clin Chem* 24:208-211

- Chen JL, Longo FJ. 1996. Expression and localization of DNA topoisomerase II during rat spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* 45:61-71
- Christiansen E, Tollefsrud A, Purvis K. 1991. Sperm quality in men with chronic abacterial prostatovesiculitis verified by rectal ultrasonography. *Urology* 38:545-549
- Clausen OPF, Parvinen M, Kirkhus B. 1982. Stage related variations in DNA fluorescence distribution during rat spermatogenic cycle. *Cytometry* 2:421-425
- Cohen J, Edwards R, Fehilly C, Fishel S, Hewitt J, Purdy J, Rowland G, Steptoe P, Webster J. 1985. In vitro fertilization: a treatment for male infertility. *Fertil Steril* 43:422-432
- Cohen PE, Pollard JW. 1995. Cytokines and growth factors in reproduction. In: Bronson R, (Hrsg.). *Reproductive immunology*. Cambridge, MA: Blackwell Science
- Comhaire F, Bosmans E, Ombelet W, Punjabi U, Schoonjans F. 1994. Cytokines in semen of normal men and of patients with andrological diseases. *Am J Reprod Immunol* 31:99-103
- Comhaire FH, Mahmoud AM, Depuydt CE, Zalata AA, Christophe AB. 1999. Mechanism and effect of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 5:393-398
- Comhaire FH, Rowe PJ, Farley TM. 1986. The effect of doxycycline in infertile couples with male accessory gland infection: a double blind prospective study. *Int J Androl* 9:91-98
- Comhaire FH, Vermeulen L, Pieters O. 1989. Study of the accuracy of physical and biochemical markers in semen to detect infectious dysfunction of the accessory sex glands. *J Androl* 10:50-53
- Comhaire FH, Verschraegen G, Vermeulen L. 1980. Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. *Int J Androl* 3:32-45
- Cooper TG. 1986. *The epididymis, sperm maturation, and fertilization*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer-Verlag
- Cooper TG, Weidner W, Nieschlag E. 1990a. The influence of inflammation of the human genital tract on secretion of the seminal markers  $\alpha$ -glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *Int J Androl* 13:329-336
- Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Jockenhövel F, Nieschlag E. 1990b. Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of  $\alpha$ -glucosidase in seminal plasma. *Int J Androl* 13:297-305



- Corselli J, Talbot P. 1987. In vitro penetration of hamster oocyte-cumulus complexes using physiological numbers of sperm. *Dev Biol* 122:227-242
- Croxatto HB, Oritz ME, Diaz S, Hess R, Balmaceda J, Croxatto HD. 1978. Studies on the duration of egg transport by human oviduct. II. Ovum location at various intervals following the luteinizing hormone peak. *Am J Obstet Gynecol* 132:629-634
- Cummins JM, Yanagimachi R. 1982. Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Res* 5:239-256
- Cuvier O, Hirano T. 2003. A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *J Cell Biol* 160:645-655
- Darin-Bennet A, Ponlos A, White IG. 1976. The fatty acid composition of the major phosphoglycerides of ram and human spermatozoa. *Andrologia* 8:37-45
- D'Cruz OJ, Wang BL, Haas GG Jr. 1992. Phagocytosis of immunoglobulin G and C3-bound human sperm by human polymorphonuclear leukocytes is not associated with the release of oxidative radicals. *Biol Reprod* 46:721-732
- de Lamirande E, Gagnon C. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. effects on the motility of intact spermatozoa and sperm axonemes. *J Androl* 13:368-378
- de Lamirande E, Gagnon C. 1993a. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 16:21-25
- de Lamirande E, Gagnon C. 1993b. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidant process. *Free Radic Biol Med* 14:157-166
- de Lamirande E, Gagnon C. 1995. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 18:487-495
- de Lamirande E, Harakat A, Gagnon C. 1997a. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. *J Androl* 19:215-225
- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. 1997b. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod Review* 2:48-54
- de Lamirande E, Tsai C, Harakat A, Gagnon C. 1998. Involvement of reactive oxygen species in human sperm arcosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl* 19:585-594

- Depuydt C, Zalata A, Christophe A, Mahmoud A, Comhaire F. 1998. Mechanisms of sperm deficiency in male accessory gland infection. *Andrologia* 30:29-33
- De Yebra L, Ballesca JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R. 1993. Complete selective absence of protamine p2 in humans. *J Biol Chem* 268:10553–10557
- Diemer T, Huwe P, Ludwig M, Hauck EW, Weidner W. 2003. Urogenital infection and sperm motility. *Andrologia* 35:283-287
- Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W. 2000. Influence of urogenital infection on sperm function. *Curr Opin Urol* 10:39-44
- Dohle GR. 2003. Inflammatory-associated obstructions of the male reproductive tract. *Andrologia* 35:321-324
- Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. 1999. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis* 14:505-512
- Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. 2000. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis* 15:61-68
- Dunnick NR, Ford K, Osborne D, Carson CC 3rd, Paulson DF. 1982. Seminal vesiculography: limited value in vesiculitis. *Urology* 20:454-457
- Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. 2002. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 17:3122-3128
- Dym M, Fawcett DW. 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3:308-326
- Dym M, Romrell LJ. 1975. Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. *J Reprod Fertil* 42:1-7
- Eddy EM. 1988. The Spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD (Hrsg.). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press
- Eggert-Kruse O, Bellmann A, Rohr G, Tilgen W, Runnebaum B. 1992. Differentiation of round cells in semen by means of monoclonal antibodies and relationship with male infertility. *Fertil Steril* 58:1046-1055

- Eisermann J, Resister KB, Strickler RC, Collins JL. 1989. The effect of tumor necrosis factor on human sperm motility in vitro. *J Androl* 10:270-274
- El-Demiry MI, Hargreave TB, Busuttil A, James K, Ritchie AWS, Chisholm GD. 1985. Lymphocyte sub-populations in the male genital tract. *Br J Urol* 57:769-774
- El-Demiry MI, Hargreave TB, Busuttil A, Elton R, James K, Chisholm GD. 1987. Immunocompetent cells in human testis in health and disease. *Fertil Steril* 48:470-479
- Endtz AW. 1974. A rapid staining method for differentiating granulocytes from germinal cells in Papanicolaou-stained semen. *Acta Cytol* 18:2-7
- Engh E, Clausen OPF. (1992) Relation between sperm quality and chromatin condensation measured by sperm DNA fluorescence flow cytometry. *Int J Androl* 15:407-415
- Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. 2002. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl* 23:717-723
- Esfandiari N, Saleh RA, Abdoos M, Rouzrokh A, Nazemian Z. 2002. Positive bacterial culture of semen from infertile men with asymptomatic leukocytospermia. *Int J Fertil Womens Med* 47:265-270
- Esfandiari N, Sharma RK, Saleh RA, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 2003. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *J Androl* 24:862-870
- Everaert K, Mahmoud A, Depuydt C, Maeyaert M, Comhaire F. 2003. Chronic prostatitis and male accessory gland infection- is there an impact on male infertility (diagnosis and therapy)?. *Andrologia* 35:325-330
- Fawcett DW. 1975. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 44:394-436
- Fisher H, Aitken RJ. 1997. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *J Exp Zool* 277:390-400
- Ford WCL. 1990. The role of oxygen free radicals in the pathology of human spermatozoa: Implications of IVF. In: Matson PL, Lieberman BA (Hrsg.). *Clinical IVF Forum: Current views in assisted reproduction*. Manchester: University Press, 123-139
- Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A. 1992. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 15:330-337

- Fraczek M, Sanocka D, Kurpisz M. 2004. Interaction between leucocytes and human spermatozoa influencing reactive oxygen intermediates release. *Int J Androl* 27:69-75
- Francavilla F, Romano R, Santucci R, Poccia G. 1990. Effect of sperm morphology and motile sperm count on outcome of intrauterine insemination in oligozoospermia and/or asthenozoospermia. *Fertil Steril* 53:892-897
- Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. 2000. Sperm chromatin. *Arch Androl* 45:215-225
- Furuchi T, Masuko K, Nishimune Y, Obinata M, Matsui Y. 1996. Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia. *Development* 122:1703–1709
- Furuya R, Takahashi S, Furuya S, Kunishima Y, Takeyama K, Tsukamoto T. 2004. Is seminal vesiculitis a discrete disease entity? Clinical and microbiological study of seminal vesiculitis in patients with acute epididymitis. *J Urol* 171:1550-1553
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CV. 1987. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 236:962–964
- Gavella M, Lipovac V. 1992. NADPH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl* 28:135-141
- Giamarellou H, Tympanidis K, Bitos NA, Leonidas E, Daikos GK. 1984. Infertility and chronic prostatitis. *Andrologia* 16:417-422
- Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 2001. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 16:1922-1930
- Giwerzman A, Richthoff J, Hjøllund H, Bonde JP, Jepson K. 2003. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril* 80:1404 – 1412
- Gnarpe H, Friberg J. 1973. T-mycoplasmas on spermatozoa and infertility. *Nature* 245:97-98
- Goldberg RB, Geremia R, Bruce WR. 1977. Histone synthesis and replacement during spermatogenesis in the mouse. *Differentiation* 7:167–180
- Gomez E, Buckingham D, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. 1996. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress and sperm function. *J Androl* 17:276–287

- Gonzales GF, Kortebani G, Mazzoli AB. 1992. Leukocytospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. *Fertil Steril* 57:1058-1065
- Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. 1993. Presence of strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 207:202–205
- Gouletsou PG, Fthenakis GC, Cripps PJ, Papaioannou N, Lainas T, Psalla D, Amiridis GS. 2004. Experimentally induced orchitis associated with *Arcanobacterium pyogenes*: clinical, ultrasonographic, seminological and pathological features. *Theriogenology* 62:1307-1328
- Grow DR, Oehninger S, Seltman HJ, Toner JP, Swanson RJ, Kruger TF, Muasher SJ. 1994. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. *Fertil Steril* 62:559-567
- Grunewald S, Paasch U, Said TM, Sharma RK, Glander HJ, Agarwal A. 2005. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril* 83:1106-1112
- Guerin JF, Rollet J, Perrin P, Menezo Y, Origiazzi A, Czyba JC. 1981. Enzymes in the seminal plasma from azoospermic men: correlation with the origin of their azoospermia. *Fertil Steril* 36:368-372
- Haidl G. 1990. Macrophages in semen are indicative of chronic epididymal infection. *Arch Androl* 25:5-11
- Haidl G, Hartmann R, Hofmann N. 1987. Morphological studies on spermatozoa in motility disorders. *Andrologia* 19:433-447
- Hales BF, Crosman K, Robaire B. 1992. Increased postimplantation loss and malformations among the F2 progeny of male rats chronically treated with cyclophosphamide. *Teratology* 45:671–678
- Henkel R. 2006. DNA and its influence on fertilization and pregnancy. In: Kruger TF, Oehninger S (Hrsg.). *Diagnosis and Treatment of Male Infertility*. Francis & Taylor (Parthenon Publishing Group); (accepted)

- Henkel R, Defosse K, Koyro HW, Weissmann N, Schill WB. 2003c. Estimate of oxygen consumption and intracellular zinc concentration of human spermatozoa in relation to motility. *Asian J Androl* 5:3-8
- Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF. 2004. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 81:965-972
- Henkel R, Ichikawa T, Sanchez R, Miska W, Ohmori H, Schill WB. 1997. Differentiation of ejaculates showing reactive oxygen species production by spermatozoa or leukocytes. *Andrologia* 29:295-301
- Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill WB, Kruger TF. 2003a. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online* 7:477-484
- Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, Schill WB, Kruger TF. 2005. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 83:635-642
- Henkel R, Maass G, Hajimohammad M, Menkveld R, Stalf T, Villegas J, Sanchez R, Kruger TF, Schill WB. 2003b. Urogenital inflammation: Changes of leukocytes and ROS. *Andrologia* 35:309-313
- Henkel R, Schill WB. 1998. Sperm separation in patients with urogenital infections. *Andrologia* 30:91-97
- Henkel R, Stalf T, Miska W. 1992. Isolation and partial characterization of outer dense fiber proteins from human spermatozoa. *Biol Chem Hoppe Seyler* 373:685-689
- Henkel R, Ludwig M, Schuppe HC, Diemer T, Schill WB, Weidner W. 2006. Chronic pelvic pain syndrome/ chronic prostatitis affect the acrosome reaction in human spermatozoa. *World J Urol* DOI 10.1007/s00345-005-0038-y
- Hermansen MC, Chusid MJ, Sty JR. 1980. Bacterial epididymo-orchitis in children and adolescents. *Clin Pediatr (Phila)* 19:812-815
- Hermo L, Lalli M. 1978. Monocytes and mast cells in the limiting membrane of human seminiferous tubules. *Biol Reprod* 19:92-100

- Hill JA, Haimovici F, Politch JA, Anderson DJ. 1987. Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertil Steril* 47:460-465
- Hirano T. 2002. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev* 16:399-414
- Hochreiter WW. 2001. Male accessory gland infection: standardization of inflammatory parameters including cytokines. *Andrologia* 35:300-303
- Hochreiter WW, Nadler RB, Koch AE, Campbell PL, Ludwig M, Weidner W, Schaeffer AJ. 2000. Evaluation of the cytokines interleukin 8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 as indicators of inflammation in prostatic secretions. *Urology* 56:1025-1029
- Hofmann N. 1975. Klinisch-andrologische Untersuchungen bei chronischen Entzündungen und Entzündungsfolgen von Prostata, Bläschendrüse und Nebenhoden. In: Schirren (Hrsg.). *Fertilitätsstörungen und chronische Entzündungen im Genitalbereich*. Berlin: Grosse, Kapitel 3-4, S. 10-37
- Hofmann N, Klasa M, Behrendt H, Hilscher B, Haider SG, Passia D, Hilscher W. 1983. Appearance of mast cells in human testis with Sertoli Cell Only syndrome. *Fortschr Androl* 8:122-129
- Holland MK, Alvarez JG, Storey BT. 1982. Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 27:1109-1118
- Holstein AF. 1969. *Morphologische Studien am Nebenhoden des Menschen*. Stuttgart: Thieme-Verlag
- Holstein AF. 1978. Spermatophagy in the seminiferous tubules and excurrent ducts of the testis in rhesus monkey and in man. *Andrologia* 10:331-352
- Huckins C. 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rat: An analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* 190:905-926
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. 1996. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 2:613-619

- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. 1998. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 13:1240-1247
- Huijin C, Junyan Z, Naigun C. 1998. Prostatic fluid and sperm examination: 106 cases. Preliminary study on infertility. *Act Urolog Belg* 66:19-21
- Huszar G, Vigue L. 1994. Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *J Androl* 17:276-287
- Ikeuchi T, Ueno M, Yogi S, Hasegawa K, Sasaki H, Hamashima T. 1991. Clinical studies on chronic prostatitis and prostatitis-like syndrome. (5) Evaluation of prostatitis complicated by anal disease. *Hinyokika Kiyo* 37:1677-1682
- Indudhara R, Das K, Sharma M, Vaidyanathan S. 1991. Seminal vesiculitis due to *Mycobacterium gastri* leading to male infertility. *Urol Int* 46:99-100
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *J Androl* 21:33-44
- Iwasaki A, Gagnon C. 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 31:531-537
- Jaiswal BS, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspar I, Eisenbach M. 1998. Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS Lett* 427:309-313
- Jang TL, Schaeffer AJ. 2003. The role of cytokines in prostatitis. *World J Urol* 21:95-99
- Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F. 1997. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of non-smoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 89:238-244
- John H, Barghorn A, Funke G, Sulser T, Hailemariam S, Hauri D, Joller-Jemelka H. 2001. Noninflammatory chronic pelvic pain syndrome: immunological study in blood, ejaculate and prostate tissue. *Eur Urol* 39:72-78
- Johnson MH. 1970. An immunological barrier in the guinea pig testis. *J Pathol* 101:129-139
- Johnston RB Jr. 1978. Oxygen metabolism and the microbicidal activity of macrophages. *Fed Proc* 37:2759-2764



- Jones R, Brown CR, Lancaster RT. 1988. Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of its role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. *Development* 102:781-792
- Jones R, Mann T, Sherins P. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31:531-537
- Kaleli S, Öçer F, Irez T, Budak E, Aksu MF. 2000. Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility? The role of different seminal leukocyte concentrations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 89:185–191
- Katz DF, Davis RO, Drobnis EZ, Overstreet JW. 1993. Sperm motility measurement and hyperactivation. *Semin Reprod Endocrinol* 11:27-39
- Kemal Duru N, Morshedi M, Oehinger S. 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 74:1200-1207
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257
- Kessopoulou E, Tomlinson MJ, Barratt CL, Balton AE, Cooke ID. 1992. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leukocytes?. *J Reprod Fertil* 94:463-470
- Kiessling AA, Lamparelli N, Yin HZ, Seibel MM, Eyre RC. 1995. Semen leukocytes: friends or foes?. *Fertil Steril* 64:196–198
- Kishimoto T, Hibi M, Murakami M, Narazaki M, Saito M, Taga T. 1992. The molecular biology of interleukin 6 and its receptor. *Ciba Found Symp* 167:5-16
- Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. 1991. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility; superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod* 6:987-991
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. 1997. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 68:519-524
- Kovalski N, de Lamirande E, Gagnon C. 1991. Determination of neutrophil concentration in semen by measurement of superoxide radical formation. *Fertil Steril* 56:946-953

- Kovalski NN, de Lamirande E, Gagnon C. 1992. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil Steril* 58:809-816
- Kramer MD, Simon MM, Tilgen W, Naher H, Justus CW, Petzoldt D. 1992. Alpha 2-macroglobulin and alpha 2-macroglobulin/proteinase complexes in human seminal fluid. *Fertil Steril* 57:417-421
- Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin KM. 1994. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 6:279-289
- Krause W, Bohring C, Gueth A, Horster S, Krisp A, Skrzypek J. 2003. Cellular and biochemical markers in semen indicating male accessory gland inflammation. *Andrologia* 35:279-282
- Krausz C, Forti G, McElreavey K. 2003. The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl* 26:70-75
- Krausz C, Mills C, Rogers S, Tan SL, Aitken RJ. 1994. Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: relationship with motility and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 62:599-605
- Krausz C, West K, Buckingham D, Aitken RJ. 1992. Development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leukocytes. *Fertil Steril* 57:1317-1325
- Krieger JN. 1984. Epididymitis, orchitis, and related conditions. *Sex Transm Dis* 11:173-181
- Krieger JN, Berger RE, Ross SO, Rothman I, Muller CH. 1996. Seminal fluid findings in men with nonbacterial prostatitis and prostatodynia. *J Androl* 17:310-318
- Krishnan R, Heal MR. 1991. Study of the seminal vesicles in acute epididymitis. *Br J Urol* 67:632-637
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. 1988. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 49:112-117
- Kruger TF, Coetzee K. 1999. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 5:172-178
- Kumaroo KK, Jahnke G, Irvin JL. 1975. Changes in basic chromosomal proteins during spermatogenesis in the mature rat. *Arch Biochem Biophys* 168:413-424

- Langlais J, Roberts D. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 12:183-224
- Larson-Cook K, Brannian J, Hansen K, Kasperson K, Aamold E, Evenson DP. 2003. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 80:895-902
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med* 22:643-656
- Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. 1997. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138:2081–2088
- Leib Z, Bartoov B, Eltes F, Servadio C. 1994. Reduced semen quality caused by chronic abacterial prostatitis: an enigma or reality?. *Fertil Steril* 61:1109-1116
- Lekili M, Tekgul S, Ergen A, Tasar C, Hascelik G. 1992. Acute experimental unilateral orchitis in the rabbit and its effect on fertility. *Int Urol Nephrol* 24:291-297
- Lewis JD, Saperas N, Song Y, Zamora MJ, Chiva M, Ausio J. 2004. Histone H1 and the origin of protamines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4148-4152
- Lindemann CB. 1996. Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model. *Cell Motil Cytoskeleton* 34:258-270
- Lippert H (Hrsg.). 2000. *Lehrbuch Anatomie. Fünfte Auflage.* München, Jena: Urban & Fischer-Verlag, 411-427
- Litwin MS, McNaughton-Collins M, Fowler FJ Jr, Nickel JC, Calhoun EA, Pontari MA, Alexander RB, Farrar JT, O'Leary MP. 1999. The National Institutes of Health chronic prostatitis symptom index: development and validation of a new outcome measure. Chronic Prostatitis Collaborative Research Network. *J Urol* 162:369-375
- Liu DY, Baker HWG. 1993. Inhibition of acrosin activity with a Trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biol Reprod* 48:340-348
- Liu DY, Baker HW. 1996. Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding. *Fertil Steril* 66:312-315

- Liu HC, Tsai TC, Chang PY, Shih BF. 1994. Varicella orchitis: report of two cases and review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* 13:748-750
- Lopes S, Jurisicova A, Casper RF. 1998a. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intrauterine cytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 13:703-708
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. 1998b. Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 13:896-900
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. 1998c. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor quality sperm samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 69:528-532
- Lovaas E, Carlin G. 1991. Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent. *Free Radic Biol Med* 11:455-461
- Ludwig M, Kümmel C, Schroeder-Printzen I, Ringert RH, Weidner W. 1998. Evaluation of seminal plasma parameters in patients with chronic prostatitis or leukocytospermia. *Andrologia* 30:41-47
- Ludwig M, Vidal A, Diemer T, Pabst W, Failing K, Weidner W. 2003. Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: seminal markers of inflammation. *World J Urol* 21:82-85
- Luo X, Badihardjo I, Zon H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490
- Maegawa M, Kamada M, Irahara M, Yamamoto S, Yamano S, Ohmoto Y, Gima H, Thaler CJ, Aono T. 2001. Concentration of granulocyte elastase in seminal plasma is not associated with sperm motility. *Arch Androl* 47:31-36
- Malech HL, Gallin JI. 1987. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* 317:687-694
- Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. 1995. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to Chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 52:864-867

- Manicardi GC, Tombacco A, Bizzaro D, Bianchi U, Bianchi PG, Sakkas D. 1998. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J* 30:33–39
- Mann T. 1948. Fructose and fructolysis in semen in relation to fertility. *Lancet* 1:446–448
- Mann T, Lutwak-Mann C. 1981. Male reproductive function and semen. New York: Springer Verlag
- Maruyama DK, Hale RW, Rogers BJ. 1985. Effect of white blood cells on the in vitro penetration of zona-free hamster eggs by human spermatozoa. *J Androl* 6:127–135
- Maseki Y, Miyake K, Mitsuya H, Kitamura H, Yamada K. 1981. Mastocytosis occurring in the testes from patients with idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 36:814–817
- McPherson SMG, Longo FJ. 1992. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev* 31:268–279
- McPherson SMG, Longo FJ. 1993a. Chromatin structure–function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 37:109–128
- McPherson SMG, Longo FJ. 1993b. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol* 158:122–130
- McVicar CM, McClure N, Williamson K, Dalzell LH, Lewis SEM. 2004. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertil Steril* 81:767–774
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. 2003. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111:483–488
- Meizel S. 1985. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with mammalian sperm surface. *Am J Anat* 174:285–302
- Menkveld R, El-Garem Y, Schill WB, Henkel R. 2003a. Relationship between human sperm morphology and acrosomal function. *J Assist Reprod Genet* 20:432–438
- Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD. 1991. Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 30:346–352
- Menkveld R, Huwe P, Ludwig M, Weidner W. 2003b. Morphological sperm alterations in different types of prostatitis. *Andrologia* 35:288–293

- Menkveld R, Kruger TF. 1998. Sperm morphology and male urogenital infections. *Andrologia* 30:49-53
- Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. 1990. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 5:586-592
- Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. 2001. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod* 16:1165-1171
- Merkle W (Hrsg). 1997. Urologie. Erste Auflage. Stuttgart: Hippokrates-Verlag, 133-148
- Meucci E, Milardi D, Mordente A, Martorana GE, Giacchi E, De Marinis L, Mancini A. 2003. Total antioxidant capacity in patients with varicoceles. *Fertil Steril* 79:1577-1583
- Miller LJ, Fischer KA, Goralnick SJ, Litt M, Burleson JA, Albertsen P, Kreutzer DL. 2002. Interleukin-10 levels in seminal plasma: implication for chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome. *J Urol* 167:753-756
- Minzter A. 1963. Orchitis as a complication of Cocksackie Virus infection. *J Med Soc N J* 60:463-466
- Moore A, Penfold LM, Johnson JL, Latchman DS, Moore HDM. 1993. Human sperm-egg binding is inhibited by peptides corresponding to the core region of an acrosomale serine protease inhibitor. *Mol Reprod Dev* 34:280-291
- Morris DD, Ilott S, Dixon L, Brison DR. 2002. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 17:990-998
- Mortimer D. 1991. Sperm separation techniques and iatrogenic failures of in vitro fertilization. *Hum Reprod* 6:173-176
- Motchnik PA, Podda A. 1997. Oxidative damage to sperm DNA. In: Ochsendorf FR, Fuchs J (Hrsg.). *Oxidative stress in male infertility*. St. Augustin: Gardez!, 129-140
- Motrich RD, Maccioni M, Molina R, Tissera A, Olmedo J, Riera CM, Rivero VE. 2005. Reduced semen quality in chronic prostatitis patients that have cellular autoimmune response to prostate antigens. *Hum Reprod* 20:2567-2572

- Munuce MJ, Berta CL, Pauluzzi F, Caille AM. 2000. Relationship between antisperm antibodies, sperm movement, and semen quality. *Urol Int* 65:200-203
- Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. 2003. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl* 24:253-262
- Nadler RB, Koch AE, Calhoun EA, Campbell PL, Pruden DL, Bennett CL, Yarnold PR, Schaeffer AJ. 2000. IL-1 beta and TNF-alpha in prostatic secretions are indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis. *J Urol* 164:214-218
- Nagai T, Takaba H, Miyake K, Hirabayashi Y, Yamada K. 1992. Testicular mast cell heterogeneity in idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 57:1331-1336
- National Institutes of Health summary statement. 1995. Institutes of Health/ National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease. Workshop on chronic prostatitis. Bethesda, Maryland
- Naz RK, Kaplan P. 1994. Increased levels of interleukin-6 in seminal plasma of infertile men. *J Androl* 15:220-227
- Nikkanen V, Grönroos M, Suominen J, Multamäki S. 1979. Silent infection in male accessory genital organs and male infertility. *Andrologia* 11:236-241
- Nishimura T, Abe H, Ito H, Ikeda K, Oka F, Yamamoto M. 1998. IL-1ra versus IL-1 levels in prostatic fluid from prostatitis patients. *Urol Int* 60:92-96
- Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Shiotani M, Mori T, Matsuda T, Yoshida O. 1992. Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. *Hum Reprod* 7:81-85
- Ochsendorf FR, Thiele J, Fuchs J, Schuttau H, Freisleben HJ, Baslan M, Milbradt R. 1994. Chemiluminescence in semen of infertile men. *Andrologia* 26:289-293
- Ochsendorf FR. 1998. Infection and reactive oxygen species. *Andrologia* 30:81-86
- Ochsendorf FR. 1999. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 5:399-420
- Ochsendorf FR, Podda M. 1999. The role of reactive oxygen species in male infertility. *Reproduktionsmedizin* 15:393-404

- Oehninger S, Acosta AA, Morshedi M, Veeck L, Swanson RJ, Simmons K, Rosenwaks Z. 1988. Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. *Fertil Steril* 50:283-287
- Oehninger S, Blackmore P, Mahony M, Hodgen G. 1995. Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 12:41-47
- Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS. 1985. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat* 174:269-283
- Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ Jr, Alvarez JG. 2001. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 16:1912-1921
- Olsen GP, Shields JW. 1984. Seminal lymphocytes, plasma and AIDS. *Nature* 309:116-117
- Omu AE, al-Othman S, Mohamad AS, al-Kaluwby NM, Fernandes S. 1998. Antibiotic therapy for seminal infection. Effect on antioxidant activity and T-helper cytokines. *J Reprod Med* 43:857-864
- Osegbe DN. 1991. Testicular function after unilateral bacterial epididymo-orchitis. *Eur Urol* 19:204-208
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Potts JM, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. 2000a. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology* 55:881-885
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. 2000b. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 73:459-464
- Pawlak W, Kedziora J, Zolynski K, Kedziora-Kornatowska K, Blaszczyk J, Witkowski P. 1998. Free radicals generation by granulocytes from men during bed rest. *J Gravit Physiol* 5:131-132
- Phadke AM. 1975. Spermiphage cells in man. *Fertil Steril* 26:760-774
- Phadke AM, Phadke GM. 1961. Occurrence of macrophage cells in the semen and in the epididymis in cases of male infertility. *J Reprod Fertil* 2:400-403
- Plante M, de Lamirande E, Gagnon C. 1994. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril* 62:387-393



- Poccia D. 1986. Remodelling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development. *Int Rev Cytol* 105:1–65
- Pöllänen P, Cooper TG. 1994. Immunology of the testicular excurrent ducts. *J Reprod Immunol* 26:167-216
- Pöllänen P, Niemi M. 1987. Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *Int J Androl* 10:37-42
- Ponniah S, Arah I, Alexander RB. 2000. PSA is a candidate self-antigen in autoimmune chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Prostate* 44:49-54
- Potts JM, Pasqualotto FF. 2003. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Andrologia* 35:304-308
- Print CG, Loveland KL. 2000. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 22:423-430
- Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mändar R. 2003. The limit of leukocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia* 35:271–278
- Qiu J, Hales BF, Robaire B. 1995. Damage to rat spermatozoal DNA after chronic cyclophosphamid exposure. *Biol Reprod* 53:1465-1473
- Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. 1985. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 44:493-498
- Rajagopal AS. 2004. Pseudomonas orchitis in puberty. *Int J STD AIDS* 15:707-708
- Ralston LS, Saiki AK, Powers WT. 1960. Orchitis as a complication of infectious mononucleosis. *JAMA* 173:1348-1349
- Ramos L, Wetzels AMM. 2001. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Hum Reprod* 16:1703–1707
- Riedel HH, Semm K. 1980. Leucospermia and male fertility. *Arch Androl* 4:51-56
- Ritchie AWS, Hargreave TB, James K, Chisholm GD. 1984. Intraepithelial lymphocytes in the normal epididymis: a mechanism for tolerance to sperm-autoantigens?. *Br J Urol* 56:79-84
- Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. 2003. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 70:518-522

- Robertson L, Wolf DP, Tash JS. 1988. Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identifications and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol Reprod* 39:797-805
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. 1997. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16:2262–2270
- Rothe G, Valet G. 1990. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 47:440-448
- Said T, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Sikka SC. 2005a. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril* 83:95-103
- Said T, Aziz N, Sharma RK, Lewis-Jones I, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 2005b. Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. *Asian J Androl* 7:121-126
- Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. 1995. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl* 16:80–87
- Sakkas D, Manicardi GC, Bianchi PG, Bizzaro D, Bianchi U. 1995. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 52:1149–1155
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. 1999a. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 4:31-37
- Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. 1999b. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 251:350-355
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. 2002. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66:1061-1067
- Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. 2003. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 7:428-432

- Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A. 1996. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 11:837-843
- Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG. 2002a. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril* 78:1215-1224
- Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DN, Thomas AJ Jr 2002b. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 78:491-499
- Sanocka D, Jedrzejczak P, Szumala-Kaekol A, Fraczek M, Kurpysz M. 2003. Male genital tract inflammation: The role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma. *J Androl* 24:448-455
- Sathananthan AH, Trounson AO. 1982. Ultrastructure of cortical granulae release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized in vitro. *Gamete Res* 6:225-234
- Schill WB, Feifel M, Fritz H, Hammerstein J. 1981. Inhibitors of acrosomal proteinase as antifertility agents. A problem of acrosomal membrane permeability. *Int J Androl* 4:25-38
- Schmidt U, Hartmann M, Pfutzner H. 1988. Pathogen spectrum of non-gonorrhea urethritis. *Z Urol Nephrol* 81:329-334
- Schopf RE, Schramm P, Benes P, Morsches B. 1984. Seminal plasma-induced suppression of the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Andrologia* 16:124-128
- Schröder JM. 1992. The neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8, a novel neutrophil chemotactic cytokine. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 40:23-31
- Schulze-Osthoff K, Walczak H, Droge W, Krammer PH. 1994. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* 127:15–20
- Schuppe HC, Meinhardt A. 2005. Immune privilege and inflammation of the testis. *Chem Immunol Allergy* 88:1-14

- Serres C, Escalier D, David G. 1983. Ultrastructural morphometry of the human sperm flagellum with a stereological analysis of the length of the dense fibres. *Biol Cell* 49:153-161
- Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 1999. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod* 14:2801-2807
- Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 2001. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl* 22:575-583
- Sharma RK, Said T, Agarwal A. 2004. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 6:139-148
- Shen H, Chia S, Ong C. 1999. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl* 20:718-723
- Sheweita SA, Tilmisany AM, al-Sawaf H. 2005. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 6:495-501
- Shi YC, Sun HM, Shang XJ, Zhu PY, Huang JF. 2005. Total antioxidant capacity of seminal plasma in fertile and infertile men. *Zhonghua Nan Ke Xue* 11:915-917
- Shimoya K, Matsuzaki N, Tsutsui T, Taniguchi T, Saji F, Tanizawa O. 1993. Detection of interleukin-8 (IL-8) in seminal plasma and elevated IL-8 in seminal plasma of infertile patients with leukospermia. *Fertil Steril* 59:885-888
- Shoskes DA, Albakri Q, Thomas K, Cook D. 2002. Cytokine polymorphisms in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: association with diagnosis and treatment response. *J Urol* 168:331-335
- Sikka SC. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 8:851-862
- Simbini T, Umapathy E, Jacobus E, Tendaupenyu G, Mbizvo MT. 1998. Study on the origin of seminal leucocytes using split ejaculate technique and the effect of leucocytospermia on sperm characteristics. *Urol Int* 61:95-100

- Sinha Hikim AP, Rajavashisth TB, Sinha Hikim I, Lue Y, Bonavera JJ, Leung A, Wang C, Swerdloff RS. 1997. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod* 57:1193–1201
- Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E. 1996. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod* 11:1655-1660
- Somekh E, Gorenstein A, Serour F. 2004. Acute epididymitis in boys: evidence of a post-infectious etiology. *J Urol* 171:391-394
- Stambaugh R, Buckley J. 1970. Comparative studies of the acrosomal enzymes of rabbit, rhesus monkey, and human spermatozoa. *Biol Reprod* 3:275-282
- Stav K, Zisman A, Leibovici D, Sandbank J, Lindner A. 2003. Acute epididymitis. *Harefuah* 142:451-455
- Steller H. 1995. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-1449
- Storey BT. 1995. Interactions between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view. *Reprod Fertil Dev* 7:927-942
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75:1169–1178
- Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, Aitken RJ. 1995. Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fertil Steril* 63:1293-1300
- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. 1997. Detection of Deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: Correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 56:602-607
- Suominen JJ. 1995. Sympathetic auto-immune orchitis. *Andrologia* 27:213-216
- Swan MA, Linck RW, Fawcett DW. 1980. Structure and function of the undulating membrane in spermatozoan propulsion in the toad *Bufo marinus*. *J Cell Biol* 85:866-880
- Swenson CE, Dunbar BS. 1982. Specificity of sperm-zona interaction. *J Exp Zool* 219:97-104
- Swenson CE, Toth A, O'Leary WM. 1979. *Ureaplasma urealyticum* and human fertility: the effect of antibiotic therapy on semen quality. *Fertil Steril* 31:660-665

- Talbert LM, Hammond MG, Halme J, O`Rand M, Fryer JG, Ekstrom RD. 1987. Semen parameters and fertilization of human oocytes in-vitro: a multivariable analysis. *Fertil Steril* 48:270-277
- Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. 1993. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 7:643–650
- Teebor GW, Boorstein RJ, Cadet J. 1988. The reparability of oxidative free radical mediated damage to DNA: a review. *Int J Radiat Biol* 54:131-150
- Tenopoulou M, Doulias PT, Barbouti A, Brunk U, Galaris D. 2005. Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J* 387:703-710
- Thomas J, Fishel SB, Hall JA, Green S, Newton TA, Thornton SJ. 1997. Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. *Hum Reprod* 12:2418-2421
- Thundathil J, de Lamirande E, Gagnon C. 2003. Nitric oxide regulates the phosphorylation of the threonine-glutamine-tyrosine motif in proteins of human spermatozoa during capacitation. *Biol Reprod* 68:1291-1298
- Töpfer-Petersen E, Henschen A. 1987. Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase. *FEBS Lett* 226:38-42
- Tomlinson MJ, White A, Barrat CLR, Bolton AE, Cooke ID. 1992. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes?. *Hum Reprod* 7:517-522
- Tomlinson MJ, Barratt CLR, Cooke ID. 1993. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not cause of male infertility. *Fertil Steril* 60:1069-1075
- Tomsu M, Sharma V, Miller D. 2002. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod* 17:1856-1862
- Toner JP, Mossad H, Grow DR, Morshedi M, Swanson RJ, Oehninger S. 1995. Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. *Andrologia* 27:143-148
- Tozzo PJ. 1968. Semen analysis in unilateral epididymitis. *N Y State J Med* 68:2769-2770

- Trasler JM, Hales BF, Robaire B. 1985. Paternal cyclophosphamide treatment causes fetal loss and malformations without affecting male fertility. *Nature* 316:144–146
- Trasler JM, Hales BF, Robaire B. 1986. Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats: effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. *Biol Reprod* 34:276–283
- Trasler JM, Hales BF, Robaire B. 1987. A time course study of chronic paternal cyclophosphamide treatment of rats: effects on pregnancy outcome and the male reproductive and haematologic systems. *Biol Reprod* 37:317–326
- Trum JW, Mol BWJ, Pannekoek Y, Spanjaard L, Wertheim P, Bleker OP, van der Veen F. 1998. Value of detecting leukocytospermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. *Fertil Steril* 70:315–319
- Tung KSK, Unanue ER, Dixon FJ. 1971. Pathogenesis of experimental allergic orchitis. *J Immunol* 106:1453-1472
- Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine D, Aitken RJ. 1998a. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 13:1429-1436
- Twigg J, Irvine D, Aitken J. 1998b. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 13:1864-1871
- Urch UA, Wasrdrip NJ, Hedrick JL. 1985a. Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *J Exp Zool* 233:479-483
- Urch UA, Wasrdrip NJ, Hedrick JL. 1985b. Proteolysis of the zona pellucida by acrosin: the nature of the hydrolysis products. *J Exp Zool* 236:239-243
- Urch UA, Patel H. 1991. The interaction of boar sperm proacrosin with its natural substrate, the zona pellucida and with polysulfated polysaccharides. *Development* 111:1165-1172
- Vega RE. 2002. Distal urethral web: a risk factor in prostatitis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 5:180-182

- Vicari E. 1997. Effectiveness of a short-term anti-oxidative high-dose therapy on IVF program outcome in infertile male patients with previous excessive sperm Radical Oxygen Species production, persistent even following antimicrobials administered for epididymitis: preliminary results [Vortrag]. In: Ambrosini A, Melis GB, Dalla Pria S, Dessole S (Hrsg.). Int. Meeting on Infertility and Assisted Reproductive Technology (From Research to Therapy). Porto Cervo, 93-97
- Vicari E. 1999. Seminal leukocyte concentration and related specific reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infections. *Hum Reprod* 14:2025-2030
- Vicari E. 2000. Effectiveness and limits of antimicrobial treatment on seminal leukocyte concentration and related reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infection. *Hum Reprod* 15:2536-2544
- Vigil P, Wöhler C, Bustos-Obregon E, Comhaire F, Morales P. 1994. Assessment of sperm function in fertile and infertile men. *Andrologia* 26:55-60
- Villegas J, Schulz M, Vallejos V, Henkel R, Miska W, Sanchez R. 2002. Indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies for the detection of leukocytospermia: comparison with peroxidase staining. *Andrologia* 34:69-73
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, Kopf GS. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 19:242-248
- Wang A, Fanning L, Anderson DJ, Loughlin KR. 1997. Generation of reactive oxygen species by leukocytes on sperm following exposure to urogenital tract infection. *Arch Androl* 39:11-17
- Wang AW, Politch J, Anderson D. 1994. Leukocytospermia in male infertility patients in China. *Andrologia* 26:167-172
- Wang JC, Caron PR, Kim RA. 1990. The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword?. *Cell* 62:403-406
- Wang YF, Holstein AF. 1983. Intraepithelial lymphocytes and makrophages in the human epididymis. *Cell Tissue Res* 233:517-521
- Ward WS, Coffey DS. 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44:569-574
- Wassarman PM. 1987. The biology and chemistry of fertilization. *Science* 235:553-560



- Wegelin C. 1921. Über Spermiphagie in menschlichen Nebenhoden. *Beitr Path Anat* 69:281-294
- Weidner W, Jantos C, Schiefer HG, Haidl G, Friedrich HJ. 1991. Semen parameters in men with and without proven chronic prostatitis. *Arch Androl* 26:173-183
- Weidner W, Krause W, Ludwig M. 1999. Relevance of male accessory gland infections for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Reprod Update* 5:421-432
- Weinbauer GF, Nieschlag E. 1999. Testicular physiology of primates. In: Weinbauer GF, Korte R (Hrsg.). *Reproduction in nonhuman primates*. Münster: Waxmann Verlag, 13-26
- Weiner RL. 1997. Orchitis: a rare complication of infectious mononucleosis. *Pediatr Infect Dis J* 16:1008-1009
- Weiss SJ. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320:365-376
- Whittington K, Ford WC. 1999. Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. *Int J Androl* 22:229-235
- Whittington K, Harrison SC, Williams KM, Day JL, McLaughlin EA, Hull MG, Ford WC. 1999. Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. *Int J Androl* 22:236-242
- Wolf DP. 1981. The mammalian egg's block to polyspermy. In: Mastroianni L, Biggers JD (Hrsg.). *Fertilization and embryonic development in vitro*. New York: Raven Press, 183-197
- Wolff H. 1995. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 63:1143-1157
- Wolff H, Anderson DJ. 1988. Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. *Fertil Steril* 49:497-504
- Wolff H, Bezold G, Zebhauser M, Meurer M. 1991. Impact of clinically silent inflammation on male genital tract organs as reflected by biochemical markers in semen. *J Androl* 12:331-334
- Wolff H, Politch JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ. 1990. Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril* 53:528-536

- Wolff H, Schill WB, Moritz P. 1976. Rundköpfige Spermatozoen: Ein seltener andrologischer Befund („Kugelpkopfspermatozoen“, „Globozoospermie“). *Hautarzt* 27:111-116
- World Health Organization 1999. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press
- Xavier A, Odile S. 1991. Quantitative assessment of chromatin stability alteration in human spermatozoa induced by freezing and thawing: flow cytometric study. *Ann Quant Cytol* 13:383-390
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (Hrsg.). *The physiology of reproduction*. 2. Auflage. New York: Raven Press 135-317
- Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. 1996. Is leukocytospermia clinically relevant? *Fertil Steril* 66:822-825
- Yavetz H, Harash B, Yogev L, Homonnai ZT, Paz G. 1991. Fertility of men following inguinal hernia repair. *Andrologia* 23:443-446
- Yeung CH, Nashan D, Sorg C, Oberpenning F, Schulze H, Nieschlag E, Cooper TG. 1994. Basal cells of the human epididymis-antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol Reprod* 50:917-926
- Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ. 1987. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J Immunol* 139:788-793
- Yudin AI, Gottlieb W, Meizel S. 1988. Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. *Acta Endocrinol* 27:343-355
- Zaneveld LJD, Srivastava PN, Williams WL. 1970. Inhibition by seminal plasma of acrosomal enzymes in intact sperm. *Proc Soc Exp Biol Med* 133:1172-1174
- Zeffer KB, Sauer MV. 1988. Orchitis after a rubella vaccination. A case report. *J Reprod Med* 33:80-81
- Zini A, Fischer M, Sharir S, Shayegan B, Phang D, Jarvi K. 2002. Prevalence of abnormal DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology* 60:1069-1072

- 
- Zorn B, Virant-Klun I, Meden-Vrtovec H. 2000. Semen granulocyte elastase: its relevance for the diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation. Hum Reprod 15:1978-1984

## 9. Abkürzungsverzeichnis

A.dest.	Aqua <b>d</b> estillata
CD	<b>C</b> luster of <b>D</b> ifferentiation
DHE	<b>D</b> ihydroethidium
DMSO	<b>D</b> imethylsulfoxid
DNA	<b>D</b> esoxyribonucleic <b>A</b> cid
dUDP	<b>D</b> esoxy- <b>U</b> ridind <b>i</b> phosphat
E. coli	<b>E</b> scherichia coli
FasL	Fas- <b>L</b> igand
HEPES	2-(4-(2- <b>H</b> ydroxyethyl)-1- <b>p</b> iperazinyl)-ethan-sulfonsäure
HSA	<b>H</b> uman <b>S</b> erum <b>A</b> lbumin, menschliches Serumalbumin
HTF	<b>H</b> uman <b>T</b> ubal <b>F</b> luid
ICSI	<b>I</b> ntracytoplasmic <b>S</b> perm <b>I</b> njection
IFN	<b>I</b> nterferon
Ig	<b>I</b> mmunglobulin
IL	<b>I</b> nterleukin
IUI	<b>I</b> ntrauterine <b>I</b> nsemination
IVF	<b>i</b> n-vitro <b>F</b> ertilisation
MAGI	<b>M</b> ale <b>A</b> ccessory <b>G</b> land <b>I</b> nfection
MW	<b>M</b> ittelwert
n	Fallzahl
NADPH	$\beta$ -Nicotinamid- <b>A</b> denin- <b>D</b> inucleotid- <b>P</b> hosphat
NIH	<b>N</b> ational <b>I</b> nstitute of <b>H</b> ealth
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.A.	<b>p</b> ro <b>A</b> nalysi
PBS	<b>P</b> hosphat <b>B</b> uffered <b>S</b> aline
PSA	<b>P</b> rostataspezifische <b>A</b> ntigen
r	Korrelationskoeffizient
ROS	<b>R</b> eactive <b>O</b> xygen <b>S</b> pecies
SD	<b>S</b> tandard <b>D</b> eviation, Standardabweichung
VEGF	<b>V</b> ascular <b>E</b> ndothelien <b>G</b> rowth <b>F</b> actor
TAC	<b>T</b> otal <b>A</b> ntioxidative <b>C</b> apacity
TdT	<b>T</b> erminal <b>d</b> eoxynucleotidyl <b>T</b> ransferase

---

TGF	<b>T</b> ransforming <b>G</b> roth <b>F</b> actor
TNF	<b>T</b> umornekrosefaktor
TUNEL	<b>T</b> erminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUDP-biotin <b>e</b> nd <b>l</b> abeling
WHO	<b>W</b> orld <b>H</b> ealth <b>O</b> rganization
ZP	<b>Z</b> ona <b>p</b> ellucida

## **10. Anhang**

### **10.1 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Henkel für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, für seine unermüdliche und geduldige wissenschaftliche Unterstützung trotz großer räumlicher Entfernung sowie für seine großzügige Hilfe, die mir die Nutzung technischer Geräte und Chemikalien für die Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellungen, aber auch die Verwendung umfangreicher Fachliteratur ermöglichte.

Vielen Dank an Chefarzt PD Dr. Zermann für die prompte Übernahme meiner Betreuung, nachdem Prof. Dr. Henkel nicht mehr in Jena war, für seine freundliche Unterstützung und sein Engagement.

Danken möchte ich auch Professor Dr. Schubert, der mir die uneingeschränkte Nutzung der Räumlichkeiten in der Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena sowie die Verwendung von Ejakulaten von Patienten der urologischen Poliklinik für meine Doktorarbeit ermöglichte.

Weiterhin danke ich ganz herzlich Herrn Professor Dr. Schreiber, der mir großzügig Räumlichkeiten, Messgeräte und Ejakulate der andrologischen Sprechstunde der Hautklinik der FSU Jena zur Verfügung stellte und der damit das Gelingen der Arbeit maßgeblich erleichterte.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Dr. Hipler recht herzlich für Ihre Mühe und Geduld bei der Erklärung der Funktionsweise technischer Geräte in der Hautklinik und ihre fachliche Unterstützung danken.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem Frau Weigand und Frau Ledig sowie den anderen Mitarbeitern der andrologischen Labors der Urologie und der Dermatologie für ihre große Hilfe bei der Durchführung der wissenschaftlichen Datenerhebung und ihre stets nette und engagierte Unterstützung.

---

Danke auch an die Mitarbeiter der Poliklinik und des Archivs der Urologie der FSU Jena für ihre freundliche Kooperation, die Übermittlung von Patienten und ihre Mithilfe bei der Aktendurchsicht.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden ganz herzlich dafür danken, dass sie immer für mich da waren, in mich und meine Berufswahl vertraut haben und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben, wo sie nur konnten, auch dann, wenn es einmal schwierig wurde.

## 10.2 Lebenslauf

<b>Name</b>	Sturmhoefel
<b>Vorname</b>	Anne
<b>Geburtsdatum</b>	19.08.1982
<b>Geburtsort</b>	Sonneberg
<b>1989-1993</b>	Besuch der Grundschule in Veilsdorf
<b>1993-2001</b>	Besuch des Gymnasiums in Hildburghausen
<b>Juni 2001</b>	Schulabschluss (Allgemeine Hochschulreife)
<b>September 2001</b>	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
<b>August 2003</b>	Abschluss des ersten Teils der Ärztlichen Prüfung

Anne Sturmhoefel

Jena, 27.06.2006



### 10.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Henkel, Chefarzt PD Dr. Zermann und Prof. Dr. Schreiber,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Anne Sturmhoefel

Jena, 27.06.2006